



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Identificación y caracterización de la Nicotinamida Mononucleótido Adenilil Transferasa (NMNAT) en *Trypanosoma cruzi*: Enzima clave en el metabolismo del NAD<sup>+</sup>.**

**Carlos Hernando Niño Riveros**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Bogotá, Colombia

2014



# **Identificación y caracterización de la Nicotinamida Mononucleótido Adenilil Transferasa (NMNAT) en Trypanosoma cruzi: Enzima clave en el metabolismo del NAD<sup>+</sup>.**

**Carlos Hernando Niño Riveros**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en ciencias-Bioquímica**

Directora:

Ph.D. María Helena Ramírez Hernández

Bioquímica y biología molecular de parásitos  
Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ)

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad, de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia

2014





*A Dios, mis padres, mi novia y a todos mis  
amigos, profesores y compañeros de laboratorio, que  
me hicieron disfrutar esta hermosa etapa de mi vida.*

*“la vida es para vivirla”*

*Adagio popular.*

## Agradecimientos

Agradecimientos a entidades financiadoras, quienes aportaron los fondos para la realización del presente estudio:

- Dirección de Investigación Sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia. (código Hermes: 15715)
- Colciencias mediante el programa Jóvenes investigadores e innovadores (Convocatoria 566 jóvenes investigadores e innovadores año 2012)

Agradecimientos a Los profesores y compañeros cuyo aporte intelectual fue indispensable para la ejecución de este proyecto.

- Nicolás Forero Baena: por su asesoría, enseñanza y colaboración en el desarrollo de la parte bioinformática de este estudio.
- Luis Ernesto Contreras Rodríguez: Por su enseñanza y asesoría en el desarrollo de la parte experimental de este proyecto.
- Profesora María Helena Ramírez Hernández: por su paciencia, guía, asesoría y enseñanza durante el desarrollo de todas las fases del presente estudio.

## Resumen

*Trypanosoma cruzi* es el causante de la enfermedad de Chagas. El aumento reciente de esta enfermedad, se debe en gran medida al desarrollo de resistencia por parte del parásito a las drogas comúnmente usadas contra este. Las NMNAT (EC: 2.7.7.1) catalizan un paso clave en la biosíntesis del NAD<sup>+</sup>. Dado que el NAD<sup>+</sup> es fundamental para sostener procesos fisiológicos basales en *T. cruzi*, garantizar su supervivencia en el hospedero y contribuir a los mecanismos de resistencia a drogas, la identificación de la NMNAT de *T. cruzi* (TcNMNAT) es primordial para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas contra la enfermedad de Chagas; partiendo del conocimiento de la bioquímica del parásito.

En este estudio se buscaron secuencias candidato para la TcNMNAT mediante programas de alineamiento, usando las bases de datos TritypDB y PDB. Se generaron modelos tridimensionales de la proteína correspondiente, y un mutante delecional de la misma, en el servidor I-TASSER. La secuencia identificada se amplificó y clonó en el vector de expresión pET-100. La proteína 6xHisTcNMNAT fue expresada en *E. coli* y purificada parcialmente empleando cromatografía de afinidad. De esta proteína se confirmó su actividad enzimática y se determinaron sus constantes cinéticas correspondientes; todo esto mediante ensayos enzimáticos directos empleando RP-HPLC.

En este trabajo se identificó un marco de lectura para una NMNAT en el genoma de *T. cruzi*, cuya proteína recombinante presenta actividad adenilil transferasa. Esto representa primera la identificación y caracterización cinética de una NMNAT en *Trypanosoma cruzi*; lo cual constituye un primer paso en la comprensión del metabolismo del NAD<sup>+</sup> en este parásito, dando nuevos aportes al conocimiento del metabolismo del NAD<sup>+</sup> en parásitos intracelulares.

**Palabras clave:** NAD, NMNAT, Proteína recombinante, *Trypanosoma cruzi*.

## Abstract

*Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas disease. Increase in the incidence rates of such illness, is due to resistance by the parasite to commonly used drugs against it. The NMNAT (EC: 2.7.7.1) catalyze a key step in the biosynthesis of NAD<sup>+</sup>. Since NAD<sup>+</sup> is essential for sustaining basal physiological processes in *T. cruzi*, ensuring its survival in the host, and also contributes to drug-resistance mechanisms, the identification of a *T. cruzi* NMNAT (TcNMNAT) becomes essential to develop new therapeutic strategies against Chagas disease; departing from a comprehensive knowledge of this parasite's biochemistry.

In the present study, TcNMNAT candidate sequences were searched by means of alignment programs and data bases such as TritypDB and PDB. Three dimensional models of the resultant protein and its deletional mutant were generated by the server I-TASSER. The identified candidate sequence was amplified and cloned into the expression vector pET-100; and the corresponding recombinant protein (6xHisTcNMNAT) was expressed in *E. coli* and partially purified using affinity chromatography. Enzymatic activity and the equivalent kinetic constants were determined for this protein, through direct enzymatic assays using RP- HPLC.

In this project the ORF for an NMNAT was identified in the genome of *T. cruzi* and its recombinant protein shows adenylyltransferase activity, which represents the first identification and characterization of a NMNAT in *Trypanosoma cruzi*. This finding constitutes a first approach in the understanding of this parasite's NAD<sup>+</sup> metabolism, contributing also to the understanding of NAD<sup>+</sup> metabolism in intracellular parasites.

**Keywords:** NAD, NMNAT, Recombinant protein, *Trypanosoma cruzi*,

# Contenido

Agradecimientos	VI
Resumen	VII
Abstract	VIII
Lista de figuras	3
Lista de tablas	5
I. Introducción	6
II. Hipótesis de trabajo	20
III. Objetivo principal	20
IV. Objetivos específicos	20
1. Procedimientos metodológicos	23
1.1 Aproximación bioinformática	23
1.1.1 Identificación bioinformática de la TcNMNAT	23
1.1.2 Análisis bioinformático estructural de la TcNMNAT	24
1.2 Aproximación experimental	25
1.2.1 Clonación de la <i>Tcnmnat</i>	25
1.2.2 Expresión de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT	29
1.2.3 Purificación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT	35
1.2.4 Ensayos enzimáticos	38
1.3 Generación in silico del mutante amino terminal de la TcNMNAT	39
2. Resultados experimentales	41
2.1 Aproximación bioinformática	41
2.1.1 Búsqueda de secuencias candidato	41
2.1.2 Análisis bioinformático de la estructura de la TcNMNAT putativa	43
2.2 Aproximación experimental	50
2.2.1 Obtención de Ácidos nucleicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
2.2.2 Clonación de la <i>Tcnmnat</i>	50

2.2.3	Expresión de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT	57
2.2.4	Purificación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT	64
2.2.5	Determinación de la actividad enzimática de la 6xHisTcNMNAT	77
2.2.6	Caracterización de la actividad enzimática de la 6xHisTcNMNAT	80
2.3	Generación <i>in silico</i> del mutante amino terminal de la TcNMNAT	96
3.	Discusión de resultados	102
3.1	De la aproximación informática	102
3.2	De clonación de la <i>Tcnmnat</i>	106
3.3	De la expresión de la TcNMNAT	112
3.4	De la purificación de la TcNMNAT	116
3.5	De la determinación y caracterización de la actividad enzimática	118
4.	Conclusiones y recomendaciones	133
4.1	Conclusiones	133
4.2	Recomendaciones	134
A.	Anexo: Alineamiento entre secuencias de aminoácidos de candidatos a la TcNMNAT	135
B.	Anexo: Alineamiento entre secuencias de nucleótidos de candidatos a la TcNMNAT	136
C.	Anexo: Mapa del vector pET100/D-TOPO	137
	Bibliografía	138

## Lista de figuras

**Figura 1-1:** Micrografías electrónicas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

**Figura 1-2:** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

**Figura 1-3:** Población actual estimada, infectada con *Trypanosoma cruzi*.

**Figura 1-4:** Relación entre el NAD<sup>+</sup> y la tripanotiona.

**Figura 1-5:** Rutas de biosíntesis del ácido quinolínico.

**Figura 1-6:** Convergencia de las rutas de reciclaje y síntesis de novo en la reacción catalizada por las NMNAT.

**Figura 2-1:** Modelo de estructura terciaria de la proteína putativa TcNMNAT mediante el servidor I-TASSER.

**Figura 2-2:** Alineamientos estructurales entre la TcNMNAT con la estructura terciaria de la NMNAT humana (1NUU).

**Figura 2-3:** Amplificación del ORF de la TcNMNAT a partir de DNA genómico.

**Figura 2-4:** Amplificación del fragmento codificante para la TcNMNAT por *long* PCR y PCR con *Pfu* polimerasa.

**Figura 2-5:** Transformación de células competentes TOP10 con el producto de ligación pET100/Tcnmnat.

**Figura 2-6:** Rastreo de transformantes por PCR de colonia.

**Figura 2-7:** Verificación de inserción del fragmento Tcnmnat en el vector PET100/D-TOPO por ensayos de PCR.

**Figura 2-8:** Verificación de inserción del fragmento Tcnmnat en el vector PET100/D-TOPO por ensayos de digestión con la enzima de restricción EcoRV.

**Figura 2-9:** Inducción de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en células transformadas BL21 (DE3).

**Figura 2-10:** Expresión de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en la fracción soluble e insoluble de células *E. coli* BL21 (DE3).

**Figura 2-11:** Expresión de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en fracciones solubles e insolubles de *E. coli* BL21 (DE3) y BL21-CodonPlus (DE3)-RIL.

**Figura 2-12:** Expresión de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en fracciones solubles e insolubles para *E. coli* BL21 (DE3) co-transformada con el vector pTf16.

**Figura 2-13:** Purificación parcial de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT por cromatografía de afinidad Ni-NTA. Evaluación preliminar.

**Figura 2-14:** Purificación parcial de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT por filtración en gel.

**Figura 2-15:** Precipitación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT con sulfato de amonio al 20%, acoplada a cromatografía de afinidad Ni-NTA.

**Figura 2-16:** Purificación parcial de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT por cromatografía de afinidad Ni-NTA.

**Figura 2-17:** Cromatografía de afinidad Ni-NTA de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT con elución escalonada.

**Figura 2-18:** Cromatografía de afinidad Ni-NTA de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT con elución escalonada. Eluciones con 50mM, 75mM y 250mM de imidazol.

**Figura 2-19:** Cromatografía de afinidad Ni-NTA de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT con elución escalonada. Eluciones con 50mM, 75mM, 160mM y 250mM de imidazol.

**Figura 2-20:** Determinación de la actividad enzimática de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT.

**Figura 2-21:** Determinación de temperaturas de almacenamiento de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT.

**Figura 2-22:** Actividad de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en función del tiempo.

**Figura 2-23:** Actividad de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en función de la temperatura.

**Figura 2-24:** Actividad de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en función del pH.

**Figura 2-25:** Evaluación preliminar para la determinación de constantes cinéticas de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT.

**Figura 2-26:** Curva de saturación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el NMN con ATP como sustrato en saturación (15mM).

**Figura 2-27:** Curva de saturación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el NMN bajo mayores concentraciones de buffer HEPES y  $MgCl_2$ .

**Figura 2-28:** Gráficos de Lineweaver-Burk para las curvas de saturación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT con el sustrato ATP de las figuras 2-26 y 2-27.

**Figura 2-29:** Curva de saturación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el NMN con ATP como sustrato en saturación (7,5mM).



**Figura 2-30:** Curva de saturación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el NMN usando 0,063µg de enzima.

**Figura 2-31:** Curva de saturación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el ATP utilizada en la determinación de constantes cinéticas.

**Figura 2-32:** Alineamiento múltiple de secuencias de NMNAT humanas y de *T. cruzi*.

**Figura 2-33:** Modelos y Alineamientos estructurales entre la proteína putativa TcNMNAT y su respectivo mutante delecional  $\Delta$ NT-TcNMNAT.

## Lista de tablas

**Tabla 1-1:** Secuencias de los cebadores para amplificar un posible ORF de la TcNMNAT.

**Tabla 2-1:** Candidatos a la NMNAT de *Trypanosoma cruzi*.

**Tabla 2-2:** Alineamientos entre candidatos a la NMNAT de *T. cruzi*.

**Tabla 2-3:** Marcos de lectura de TcNMNAT putativas en *T. cruzi*.

**Tabla 2-4:** Dominios y motivos en la estructura primaria de la TcNMNAT.

**Tabla 2-5:** Predicción de patrones de estructura secundaria por algoritmos de segunda y tercera generación para la TcNMNAT hipotética (candidato 2).

**Tabla 2-6:** Mejores homólogos estructurales de la TcNMNAT, según el servidor COFACTOR.

**Tabla 2-7:** Mejores análogos estructurales de la TcNMNAT, según el algoritmo *TM-align*.

**Tabla 2-8:** Comparación entre modelos de la estructura terciaria de la TcNMNAT con distintos grados de minimización de energías.

**Tabla 2-9:** Constantes cinéticas de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el NMN.

**Tabla 2-10:** Constantes cinéticas de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el ATP.

**Tabla 2-11:** Predicciones para sitios de modificaciones pos-traduccionales.

**Tabla 2-12:** Comparación entre patrones de estructura secundaria de la TcNMNAT y el mutante delecional  $\Delta$ NT-TcNMNAT.

# I. Introducción

- **El modelo de estudio: *Trypanosoma cruzi*.**

La enfermedad de Chagas es un importante problema de salud pública en los países latinoamericanos, dada su alta prevalencia y los altos niveles de morbilidad y letalidad observados en algunas de sus formas clínicas (Rassi and Marcondes de Rezende 2012). Esta enfermedad es causada por *Trypanosoma cruzi*, quien se muestra en la Figura 1-1. Este es un hemo-protozoario flagelado transmitido a vertebrados susceptibles por hemípteros hematófagos de la subfamilia *Triatominae*. En la mayoría de los casos los individuos permanecen infectados de por vida, siendo entre el 30 y 40% susceptibles de presentar inflamaciones crónicas que suelen terminar en cardiomiopatías y disfunciones del tracto gastrointestinal (Molina-garza et al. 2007). De igual forma el parásito puede ser transmitido por trasplante de órganos, transfusión de sangre, por vía oral y de madre a hijo durante el embarazo (Schmunis and Yadon 2010); en este último caso, si bien la mayoría de infantes son asintomáticos, también pueden presentar manifestaciones clínicas severas como complicaciones respiratorias, hepatomegalia, esplenomegalia, y daño neurológico. En estos casos la mortalidad es alta (Muñoz et al. 2007).

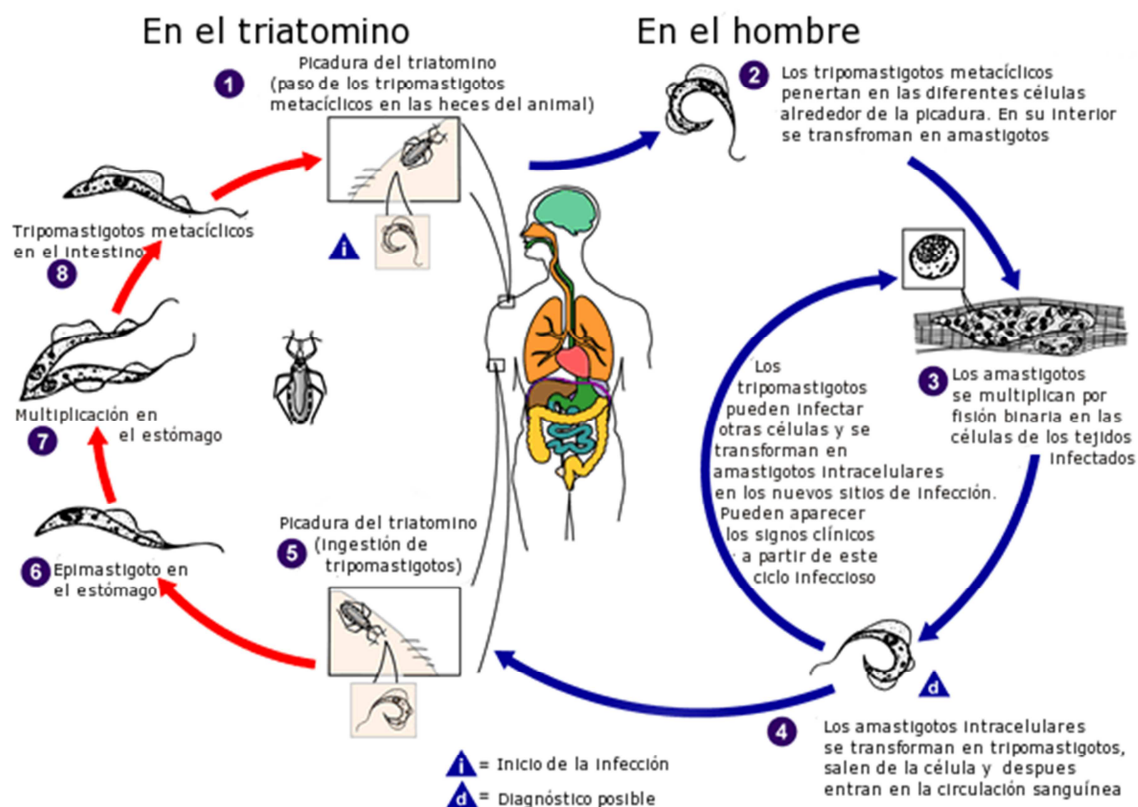


**Figura 1-1. Micrografías electrónicas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. (a) Microscopía electrónica de barrido. Se observan: flagelo (flechas pequeñas) y bolsillo flagelar (flecha grande). (b-c) Microscopía electrónica de transmisión. Sección longitudinal (b): bolsillo flagelar (Flecha gruesa), núcleo (N), kinetoplasto (K), complejo Golgi (G) y mitocondria (M). Sección transversal (c): zona de anclaje flagelar (flecha pequeña) y los microtúbulos sub-pelliculares (cabeza de flecha). En las secciones longitudinal (b) y trasversal (c) se observa el Axonema (A), El cuerpo paraflagelar (\*). Barras: a \_ 5μm; b \_ 1μm; c \_ 100nm. Tomado de:(Rocha et al. 2010)**

*T. cruzi* pertenece a la familia *Trypanosomatidae*; la cual comprende parásitos obligados que infectan vertebrados, invertebrados y algunas plantas (Stevens 2008). Varias especies de tripanosomátidos son importantes agentes patógenos para el hombre, como *Trypanosoma brucei*, causante de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño y varias especies del género *Leishmania*; quienes causan diferentes formas de leishmaniosis (Hamilton et al. 2004; Stevens 2008).

*Trypanosoma cruzi* presenta 3 estadios morfológicos durante su desarrollo: una forma con un flagelo incipiente que se divide por fisión binaria (Amastigote), un segundo estadio con un flagelo visible originado en una posición anterior al núcleo, con capacidad de dividirse pero incapaz de infectar tejido mamífero (Epimastigote), y un estadio con un flagelo largo originado en posición posterior al núcleo, incapaz de reproducirse pero capaz de infectar tejido mamífero (Trypomastigote). Su ciclo de vida se desarrolla en dos tipos de hospederos: mamíferos de hasta siete distintos órdenes (incluyendo humanos) y varias especies de insectos triatomíneos; alternando según se encuentre, entre las formas mencionadas (Rassi and Marcondes de Rezende 2012).

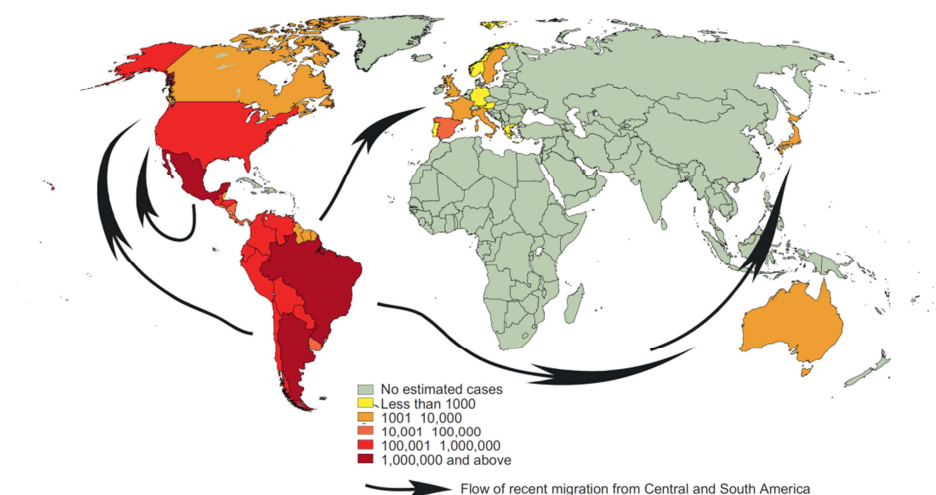
Los trypomastigotes de *T. cruzi* entran en su hospedero mamífero, cuando la herida causada por el insecto triatomíneo al alimentarse entra en contacto con las heces o la orina del mismo. Al ingresar por la herida los trypomastigotes invaden las células de los tejidos aledaños, diferenciándose en amastigotes en el interior de estas. Luego los amastigotes se dividen en el interior de la célula para así transformarse en trypomastigotes tras protruir de esta, ingresando al torrente sanguíneo. De ahí pueden infectar células de otros tejidos repitiendo el proceso. Cuando el insecto triatomíneo se alimenta de un mamífero infectado, este toma trypomastigotes presentes en el torrente sanguíneo. Días después de la alimentación, los trypomastigotes de la sangre del mamífero infectado se diferencian en epimastigotes en el tracto digestivo del insecto, donde se dividen y adhieren a las membranas perimicroviliarias de dicho tracto. Ya en el recto, una porción de los epimastigotes se diferencia como trypomastigotes, siendo eliminados en las heces y la orina, y por lo tanto perpetuando el ciclo (Rassi and Marcondes de Rezende 2012). Un esquema simplificado de este ciclo puede observarse en la figura 1-2.



**Figura 1-2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.** Fuente: (Nagajyothi et al. 2012). Editado para su traducción al español.

Se considera que la enfermedad de Chagas se encuentra restringida al área continental de América, más específicamente desde el sur de los Estados Unidos hasta Chile y Argentina (Molina-garza et al. 2007; Rassi and Marcondes de Rezende 2012; Schmunis and Yadon 2010) presentando un problema en aumento para las poblaciones locales. Estimaciones de la Organización mundial de la salud apuntan entre 13 y 15 millones de personas infectadas por *T. cruzi*, con una incidencia anual de 200.000 casos, mientras que otros estudios estiman entre 16 y 18 millones; siendo además la principal causa de enfermedades cardíacas en áreas endémicas (Molina-garza et al. 2007; Rassi and Marcondes de Rezende 2012). La Globalización del Chagas también se considera un problema de salud pública en expansión, dada la migración de poblaciones latinoamericanas a países desarrollados (entre las cuales puede haber individuos

infectados); presentando un riesgo de transmisión de la enfermedad por medio de canales que no impliquen el vector triatomíneo tradicional (Muñoz et al. 2007; Schmunis and Yadon 2010). En consecuencia la distribución geográfica de la enfermedad de Chagas se extiende más allá del continente americano, como se observa en la figura 1-3.



**Figura 1-3. Población actual estimada, infectada con *Trypanosoma cruzi*.** Fuente: (Rassi and Marcondes de Rezende 2012)

Desde comienzos de la década de los setenta, el Nifurtimox y el Benznidazol, han constituido los principales tratamientos contra la enfermedad de Chagas en distintas regiones de Suramérica. Los estudios clínicos realizados para ambos fármacos muestran una gran variabilidad y poco consenso dependiendo de los autores y las particularidades del estudio (Rodrigues Coura and de Castro 2002). En general los resultados obtenidos son positivos para los casos de fase aguda y de infección reciente. No obstante para los casos de infección crónica los resultados han sido negativos; ya que tales tratamientos presentan poca eficacia, junto con numerosos efectos colaterales adversos y contraindicaciones. Las diferencias en la susceptibilidad que presentan distintas cepas del parásito a estos medicamentos, son un elemento adicional que complica el manejo farmacológico de esta enfermedad, y puede causar el fracaso del tratamiento (Maya et al. 2007; Rodrigues Coura and de Castro 2002).

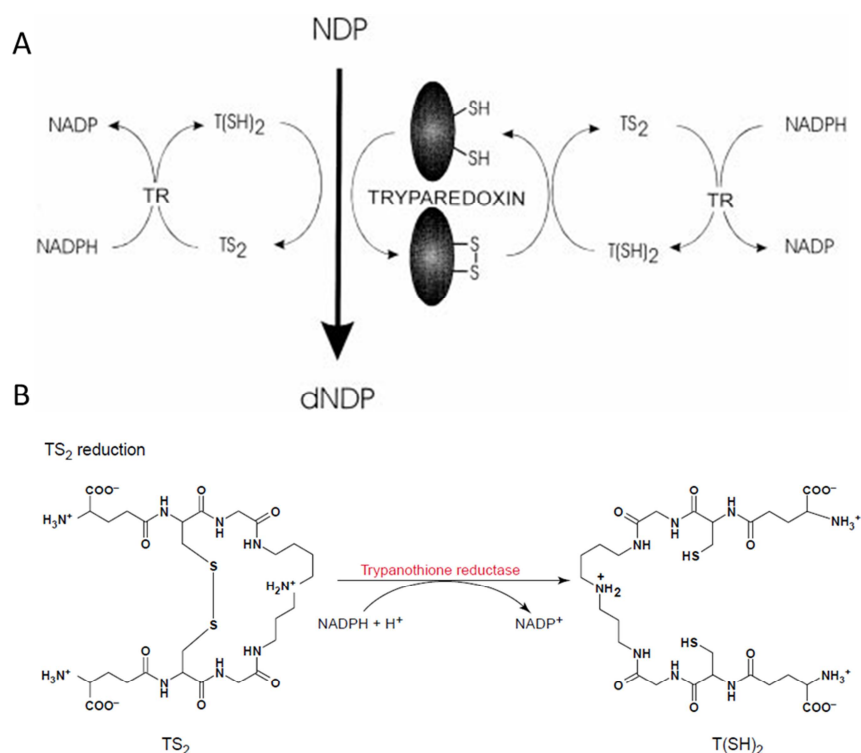
En general, la incidencia de enfermedades producidas por protozoarios del género *Trypanosoma* y *Leishmania*, no solo es el producto de factores ambientales,

sociopolíticos y culturales; sino que además se debe a la carencia de vacunas efectivas y al desarrollo de resistencia a las drogas comúnmente usadas contra estos parásitos. Esto último explica en buena parte la variabilidad en la eficacia que presenta un medicamento determinado, respecto a la cura de estos padecimientos (Borges et al. 2005; Filardi and Brener 1987; Murta et al. 1998). En consecuencia, el tratamiento de este grupo de zoonosis depende de una detección temprana y un tratamiento efectivo. Esto implica la identificación de blancos que permitan desarrollar racionalmente métodos y agentes de control, capaces de afectar el parásito sin afectar a su hospedero. Para ello es necesario encontrar diferencias fundamentales entre ambos organismos a nivel bioquímico y fisiológico.

Los parásitos intracelulares dependen de la capacidad de sus sistemas REDOX para soportar el gran estrés que demanda; tanto la eliminación de los radicales libres propios, producto de su oxidación metabólica, como su adaptación a la exposición a los radicales producidos por su hospedero. Estos sistemas antioxidantes le permiten al parásito sobrevivir en lo que de lo contrario sería un medio sumamente hostil, y adaptarse a nuevas condiciones durante el cambio de anfitrión (Paramchuk et al. 1997; Romão et al. 2006). En la última década se han identificado estos sistemas antioxidantes y de detoxificación (R.Luise Krauth-Siegel, Meiering, and Schmidt 2003; Schmidt and Krauth-Siegel 2003) donde las enzimas involucradas se consideran como blancos promisorios para el desarrollo de fármacos (Becker et al. 2000; Castro et al. 2002; R.L Krauth-Siegel and Coombs 1999a; Levick et al. 1998) Todas estas rutas y mecanismos convergen en su dependencia de los sistemas regulación del  $\text{NAD}^+$ , elemento indispensable en la reposición de tio-compuestos fundamentales como el glutatión, la tioredoxina, la glutaredoxina, la plasmoredoxina, el ovotiol y la tripanotiona (Turrens 2004).

A pesar de la hostilidad del medio en el que se desarrolla, *T. cruzi* consta de mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo menos diversos en comparación con su hospedero final mamífero; pues muchos sistemas de control de radicales libres presentes en este último no se encuentran en el parásito. En *T. cruzi* no se ha evidenciado la existencia de catalasa o glutatión-peroxidasa, y la actividad de la superóxido-dismutasa (SOD) es mínima. Además, no hay ninguna evidencia publicada de la existencia de  $\alpha$ -tocoferol en el parásito. (R.Luise Krauth-Siegel, Meiering, and Schmidt 2003; Maya et al. 2007; Turrens 2004).

Ello centra el metabolismo de especies reactivas de oxígeno en la acción de la tripanotona; un conjugado de dos moléculas de glutatión con espermidina (Dumas et al. 1997; R Luise Krauth-Siegel and Comini 2008). La tripanotona es una biomolécula presente en todos los tripanosomátidos y es indispensable para otros procesos muy importantes además del control del estrés oxidativo. Entre estos están varios mecanismos de resistencia a fármacos (Ariyanayagam et al. 2005) y la síntesis de precursores del ADN (Dormeyer et al. 2001; R Luise Krauth-Siegel and Comini 2008; Maya et al. 2007), como se muestra en la figura 1-4 A. El NADPH es una coenzima fundamental para la acción de la tripanotona-reductasa, que tal y como se muestra en la figura 1-4 B, se encarga de reducir y regenerar la tripanotona a su forma funcional (R Luise Krauth-Siegel and Comini 2008; Müller et al. 2003). En consecuencia El  $\text{NAD}^+$  se constituye como un punto clave respecto al control de especies reactivas de oxígeno en el parásito, si se tiene en cuenta su conexión con la tripanotona, como precursor del NADPH.



**Figura 1-4. Relación entre el  $\text{NAD}^+$  y la tripanotona.** A) Síntesis de deoxiribonucleótidos, dependiente de tripanotona. Izquierda: reducción espontánea de la ribonucleótido-reductasa por la tripanotona. Derecha: reducción regulada de la ribonucleótido-reductasa por medio de la triparedoxina. B) Regeneración de la tripanotona reducida por la tripanotona-reductasa. Fuentes: (Dormeyer et al. 2001; R.L Krauth-Siegel and Coombs 1999b; Müller et al. 2003)



El NAD<sup>+</sup> también es fundamental en el mantenimiento de otros sistemas contra radicales libres, como es el caso de la *Old Yellow Enzyme* de *T. cruzi* (TcOYE). Esta enzima es capaz de reducir varios tipos de drogas anti-tripanosomiasis, metabolizándolas e inhibiendo parcial o totalmente su efecto (Kubata et al. 2002). Las enzimas de esta familia son NADPH-oxidoreductasas capaces de oxidar NADPH y NADH (Brown et al. 1998, 2002); por lo que el NADH y el NADPH bien pueden aportar el poder reductor necesario en las reacciones catalizadas por la TcOYE, permitiéndole ejecutar su función.

Varios compuestos con actividad tripanocida como el Nifurtimox, el Benznidazol y sus versiones derivatizadas, explotan la poca adaptabilidad y eficiencia de los sistemas de control de especies reactivas de oxígeno del parásito. Esto se logra ya sea a través de la formación de especies reactivas de oxígeno, metabolitos electrófilos o conjugados con grupos tiol, que secuestran, reducen y/o exigen al límite, dicha precaria defensa contra el estrés oxidativo (Kubata et al. 2002; Maya et al. 2003, 2007; Uchiyama et al. 2005).

Esto en teoría debería dar lugar a un tratamiento efectivo y de acción específica; sin embargo se observa un éxito variable y relativamente pobre que se suma a una toda una serie de contraindicaciones y efectos colaterales dañinos (Rodrigues Coura and de Castro 2002). El NAD<sup>+</sup> igualmente desempeña un papel protagónico en los procesos de control de especies REDOX (como fuente última de poder reductor) y en el funcionamiento de rutas de detoxificación del parásito (ej. como cofactor de la TcOYE); además es responsable de la activación de fármacos tripanocidas mediante la acción reductasas específicas (Maya et al. 2007; Uchiyama et al. 2005).

El NAD<sup>+</sup> está involucrado en múltiples procesos que le permiten a *T. cruzi* sobrevivir, y también participa de los mecanismos en los que se basa la acción farmacológica de medicamentos como el Nifurtimox y el Benznidazol. Por lo tanto entender el funcionamiento del metabolismo NAD<sup>+</sup> en este parásito, puede ofrecer una explicación integral a fenómenos como la existencia de clones resistentes, y la susceptibilidad variable de distintas cepas a los medicamentos actualmente utilizados. En vista de los efectos colaterales nocivos que son causados por los fármacos estándar durante tratamiento de la enfermedad de Chagas, conocer cabalmente el metabolismo del NAD<sup>+</sup>

también puede servir al diseño de nuevas y mejores estrategias de control de esta enfermedad.

- ***El dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>) y su metabolismo.***

El dinucleótido de nicotinamida y adenina NAD<sup>+</sup>, y su forma fosforilada NADP<sup>+</sup>, son metabolitos derivados de la Niacina (vitamina B3) considerados como coenzimas fundamentales; dada su habilidad de transportar iones hidruro, contribuyendo al flujo REDOX de la célula al formar el par molecular NAD<sup>+</sup>/NADH (Foster and Moat 1980; Gossmann et al. 2012). Cada forma de este par participa como aceptor o donador de hidruros en múltiples reacciones de óxido-reducción en la célula. De acuerdo con la base de datos KEGG, se especifica que 1.788 reacciones de 8.807 utilizan el par NAD<sup>+</sup>/NADH o NADP<sup>+</sup>/NADPH como cofactores (Octubre 2011). La importancia del NAD<sup>+</sup> se refleja en el hecho de que sólo protones, agua y oxígeno están involucrados en un número mayor de reacciones (Gossmann et al. 2012). El NAD<sup>+</sup> participa en la regulación de múltiples rutas metabólicas, como el ciclo de ácido cítrico y la cadena respiratoria. Por ende es importante en la producción masiva de energía en forma de ATP (Foster and Moat 1980; Ghosh et al. 2010). La forma fosforilada del NAD<sup>+</sup>, el NADP<sup>+</sup> se caracteriza por participar en síntesis reductivas como la de ácidos grasos, colesterol, en procesos como la fotosíntesis, y en rutas anfibólicas como la vía de las pentosas fosfato (Foster and Moat 1980). Adicionalmente el NADP<sup>+</sup> es esencial para el mantenimiento de los mecanismos antioxidantes celulares, a través de la regeneración de compuestos tales como la tioredoxina y el glutatión (Kirsch 2001) o por medio de la reducción directa de radicales libres (Petrat et al. 2003). Las deficiencias de esta coenzima comprometen el control del estrés oxidativo (Leopold et al. 2003; Minard and McAlister-Henn 2001).

El NAD<sup>+</sup>, aparte de ser importante como cofactor, desempeña una función igualmente relevante como sustrato, pues es usado como tal por tres familias de enzimas: ADP-ribosiltransferasas (PARP), cADP-ribosasintasas y deacetilasas como las sirtuinas (Ghosh et al. 2010). Estas familias de enzimas usan al NAD<sup>+</sup> para llevar a cabo procesos que comprenden desde la modificación covalente de proteínas por acetilación o ADP-ribosilación, hasta la movilización de calcio por medio de la síntesis de ciclo-ADP-ribosa (cADPR).

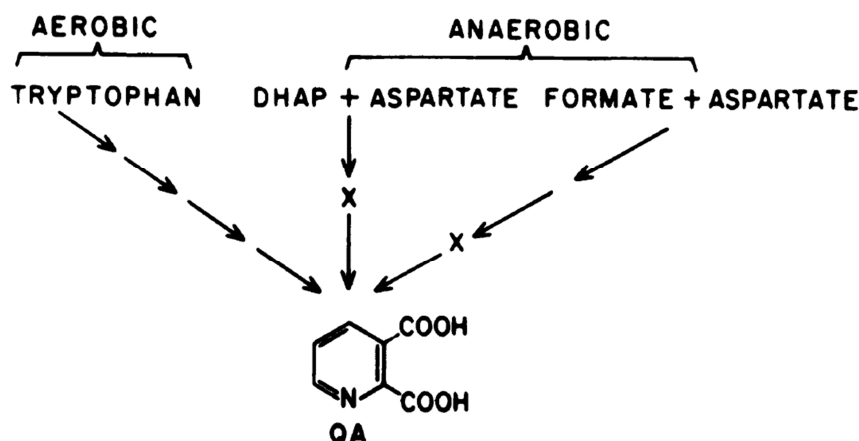
Las ADP-ribosiltransferasas son conocidas por catalizar la ADP-ribosilación. Para ello hidrolizan el NAD<sup>+</sup> generando nicotinamida y ADP-ribosa (ADPR), donde esta última es

transferida a una proteína-blanco para su modificación pos-traduccional. Esta reacción orquesta procesos celulares como la regulación de la estabilidad genómica del ADN, la expresión génica y la apoptosis (Berger, Ramirez-Hernandez, and Ziegler 2004). Las cADP-ribosintasas o NAD<sup>+</sup>-glicohidrolasas (NADasas) hidrolizan el NAD<sup>+</sup> a ADPR y nicotinamida, catalizando así la síntesis de ciclo-ADP-ribosa. Pero también pueden producir fosfato del dinucleótido de ácido nicotínico y adenina (NAADP) mediante la ruptura del NADP<sup>+</sup> (Berger, Ramirez-Hernandez, and Ziegler 2004; D'Amours et al. 1999). Estos compuestos actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales intracelulares mediante la movilización de calcio; regulando así la expresión génica en múltiples grupos de seres vivos (Berger, Ramirez-Hernandez, and Ziegler 2004; Ghosh et al. 2010; Ziegler 2000). Las Proteínas SIR2 o sirtuinas (SIR- *Silence Information Regulator*) son una importante familia de deacetilasas que asocian los cambios en los niveles de NAD<sup>+</sup> con la expresión génica. Modifican proteínas por deacetilación principalmente, o en contados casos por ADP-ribosilación. Al hidrolizar el NAD<sup>+</sup> usan la ADP-ribosa resultante como un aceptor del grupo acetilo de la proteína, para generar O-acetil-ADP-ribosa (OAADPR) (Ghosh et al. 2010). Las sirtuinas regulan la expresión de distintos sets de genes mediante la deacetilación de histonas y factores de transcripción, acoplando el metabolismo y la expresión génica; lo que las convierte en un “sensor” metabólico en los eucariontes (Gasser and Cockell 2001).

Debido a la presencia de tantas reacciones de consumo del NAD<sup>+</sup> implicadas en el desarrollo de múltiples procesos celulares, los niveles de este dinucleótido necesitan ser repuestos constantemente (Gossmann et al. 2012); ello dota de gran relevancia al estudio del anabolismo de este dinucleótido.

Si bien la síntesis del NAD<sup>+</sup> se presenta como un proceso universal, existe una notable diversidad respecto a la biosíntesis del mismo. Los dos tipos básicos de síntesis de NAD<sup>+</sup> comprenden rutas biosintéticas *de novo* y rutas biosintéticas de reciclaje (Gazzaniga et al. 2009). Las rutas de síntesis *de novo* se clasifican en dos vías para la posterior obtención del NAD<sup>+</sup>, como se muestra en la figura 1-5: la primera implica la degradación aeróbica de triptófano, (propia de células mamíferas y ciertos eucariotas inferiores) mientras que una segunda ruta anaeróbica utiliza precursores de bajo peso molecular para la síntesis del anillo de piridina del NAD<sup>+</sup>. Esta última predomina en organismos procariotas (Foster and Moat 1980; Katoh et al. 2006). Sin importar el precursor, ambas

rutas desembocan en la síntesis de ácido quinolínico, un metabolito necesario para síntesis del  $\text{NAD}^+$  por la ruta *de novo* en todos los organismos (Foster and Moat 1980). La vía *de novo* aerobia, consiste en un complejo sistema de varias reacciones que implican la degradación del triptófano y la formación del correspondiente ácido quinolínico. Esta vía se describe como aeróbica, dados los estrictos requerimientos de oxígeno de la primera y la tercera enzima de la ruta metabólica: la triptófano oxigenasa, y la quinurenina 3- hidroxilasa. La vía *de novo* anaerobia parte del L-ácido aspártico, sometiéndolo a reacciones de condensación con otros metabolitos de poco tamaño, como la dihidroxiacetona y el ácido fórmico (Foster and Moat 1980; Katoh et al. 2006).



**Figura 1-5. Rutas de biosíntesis del ácido quinolínico.** Fuentes: (Foster and Moat 1980)

Las rutas de reciclaje, se denominan como tales dado que sintetizan  $\text{NAD}^+$  a partir de los productos de su consumo; siendo el principal, la nicotinamida (Gossmann et al. 2012). Este producto se genera tras la escisión del enlace N-glicosídico entre la ADP-ribosa y la Nicotinamida en la molécula de  $\text{NAD}^+$ ; un aspecto crucial en la gran mayoría de las rutas de consumo de este dinucleótido (Berger, Ramírez-Hernandez, and Ziegler 2004). Además de la nicotinamida, otro importante precursor que alimenta tales rutas, es el ácido nicotínico o nicotinato; que en muchos organismos es producido a partir de la deamidación de la nicotinamida por parte de la Nicotinamida-deamidasa (NADA). Juntos, el ácido nicotínico y la nicotinamida, se denominan colectivamente como niacina y son los principales precursores de las rutas de reciclaje (Gazzaniga et al. 2009). Por otra parte, estudios recientes identifican a los ribósidos de la nicotinamida y el ácido nicotínico como precursores adicionales que entran a la síntesis de  $\text{NAD}^+$  por rutas alternativas (de

Figueiredo et al. 2011). Del ribósido de la nicotinamida (NaR), se sabe que contribuye a los niveles de  $\text{NAD}^+$  mediante al menos dos vías en *Saccharomyces cerevisiae* (Denu 2007). En las rutas de reciclaje, todos aquellos sub-productos del  $\text{NAD}^+$  que contienen el anillo de piridina de este (el ácido nicotínico, la nicotinamida o sus respectivos ribósidos) se importan desde el exterior de las células o se reciclan en el interior de las mismas para regenerar el  $\text{NAD}^+$  en unos pocos pasos (Gazzaniga et al. 2009). Las rutas de reciclaje son fundamentales para la gran mayoría de organismos, pues estos cuentan con sistemas enzimáticos para regenerar  $\text{NAD}^+$  ya sea partiendo de nicotinamida o de ácido nicotínico: de hecho existen especies que carecen de rutas de síntesis *de novo*, y bien parecen vivir en un ambiente rico en cualquiera de las formas de la niacina (Gossmann et al. 2012).

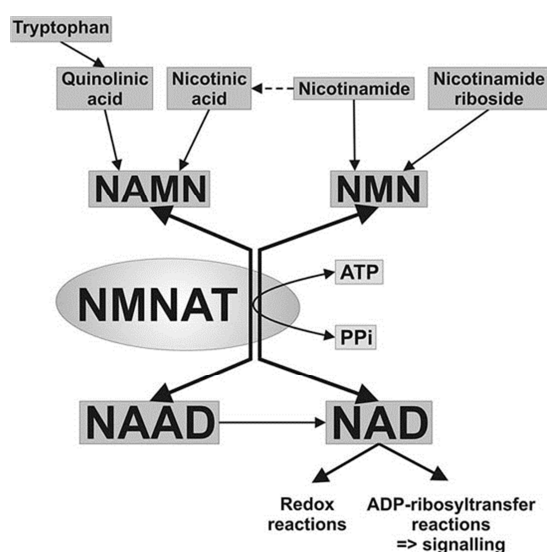
Independientemente de la ruta de procedencia (si la biosíntesis es *de novo* o de reciclaje), los pasos finales para la obtención de  $\text{NAD}^+$  implican un proceso, que como se observa en la figura 1-6, puede dividirse en dos fases: la primera implica la formación de nucleótidos de niacina: mononucleótido del nicotinato (NAMN) y mononucleótido de la nicotinamida (NMN). La segunda fase comprende la formación de  $\text{NAD}^+$  a partir de estos mononucleótidos.

En la primera fase, el ácido quinolínico, la nicotinamida y el ácido nicotínico, son sujetos de la acción de fosforibosil-transferasas específicas para sintetizar sus respectivos mononucleótidos: NAMN en el caso del ácido nicotínico o el ácido quinolínico, y NMN en el caso de la nicotinamida (Berger, Ramirez-Hernandez, and Ziegler 2004). De igual forma, los ribósidos de la Nicotinamida y el ácido nicotínico se transforman en sus respectivos nucleótidos de niacina mediante rutas alternativas. Del ribósido de la nicotinamida se sabe que es sujeto de la acción de la Nicotinamida-ribósido-quinasa (NRK) para formar NMN; pero también puede ser degradado escindiendo la nicotinamida del enlace glicosídico para incorporarla a la síntesis del  $\text{NAD}^+$  por medio de una fosforibosil-transferasa (Denu 2007).

La segunda fase de la ruta de síntesis es catalizada por la Nicotinamida mononucleótido adenilil transferasa (NMNAT). Esta enzima transfiere el adenilato del ATP al mononucleótido de niacina para dar lugar a un dinucleótido de niacina y adenina (figura 1-6). En el caso del NMN se da lugar al  $\text{NAD}^+$  y en el caso del NAMN se da lugar al dinucleótido del nicotinato (NAAD) (Lau, Niere, and Ziegler 2009).

Para el caso específico del ácido nicotínico, la síntesis de  $\text{NAD}^+$  comprende: 1) la adición de fosfo-ribosa a este produciendo NAMN, 2) la posterior adición de AMP (a partir del

ATP) por la NMNAT para sintetizar NAAD, y 3) la subsecuente amidación de este último por la NAD-sintetasa, (a partir del amonio o la glutamina) para producir  $\text{NAD}^+$ . Esta ruta en particular, se conoce como la *via Preiss-Handler* en honor a sus descubridores, y comprende el reciclaje del ácido nicotínico. Dicha ruta es predominante en organismos unicelulares, sin embargo en organismos superiores la síntesis de  $\text{NAD}^+$  ocurre de forma directa pasando de la nicotinamida al NMN y de este al  $\text{NAD}^+$ , gracias a la acción de la NMNAT (de Figueiredo et al. 2011). Finalmente el  $\text{NAD}^+$  puede ser fosforilado a  $\text{NADP}^+$  por la NAD-quinasa.



**Figura 1-6. Convergencia de las rutas de reciclaje y síntesis de novo en la reacción catalizada por las NMNAT.** Fuente: (Lau, Niere, and Ziegler 2009)

La NMNAT (EC: 2.7.7.1/18) es una enzima clave en la biosíntesis del  $\text{NAD}^+$ , pues en el paso catalizado por esta enzima, convergen tanto la rutas de síntesis *de novo* como las rutas de reciclaje. Tal es su importancia que se sabe de su existencia en todas las especies analizadas a nivel de secuencia de ADN, excepto en *Haemophilus influenzae*. No obstante, la Nicotinamida ribonucleótido adenilil transferasa (NadR) de *H. influenzae* posee actividad NMNAT y actividad Nicotinamida ribosa quinasa (NRK) (Gossmann et al. 2012). Esto deja claro que la NMNAT es esencial para la biosíntesis de  $\text{NAD}^+$ .

Existe evidencia de la presencia de las NMNAT en los tres dominios de la vida (Monica Emanuelli et al. 2003; Lau, Niere, and Ziegler 2009; Schweiger et al. 2001; Stancek, Schnell, and Rydén-Aulin 2005). En particular se han identificado isoenzimas de la

NMNAT en eubacterias como: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, en cianobacterias como *Synechocystis* ssp, y en arqueobacterias como la arquea termófila *Methanococcus jannaschii*; además de varios eucariotas (Bi, Wang, and Xie 2011; Jayaram, Kusumanchi, and Yalowitz 2011; X. Zhang et al. 2003). En el caso de los eucariontes, en la pasada década se identificaron y caracterizaron las isoenzimas humanas de la NMNAT (Berger et al. 2005; Werner et al. 2002; X. Zhang et al. 2003; Zhou et al. 2002a); estas se localizan en el núcleo, aparato de Golgi y mitocondrias respectivamente, presentando secuencias características de localización intracelular para cada organelo (Berger et al. 2005; Jayaram, Kusumanchi, and Yalowitz 2011; Lau et al. 2010; Raffaelli, Sorci, and Amici 2002). La comparación de dichas enzimas con sus equivalentes procariotas ha permitido establecer diferencias estructurales y funcionales. De estos estudios se puede concluir que las NMNAT de varios organismos muestran cierta homología, pero la variabilidad estructural es alta en muchas especies; esto concuerda con el hecho de que los procariotas como grupo muestran una gran heterogeneidad en su metabolismo y composición genética (Jayaram, Kusumanchi, and Yalowitz 2011). Para ilustrar lo anterior cabe notar que las NMNAT de bacterias, arqueobacterias y humanos comparten entre sí sólo una limitada identidad de secuencia (menor al 20%), pero dicha identidad define la conservación de aspectos estructurales vinculados al centro activo de tales enzimas (Bi, Wang, and Xie 2011).

Las rutas de biosíntesis de cofactores ofrecen un gran potencial farmacológico dado el rol fundamental que desempeñan las coenzimas en el metabolismo (Bi, Wang, and Xie 2011). Ello dota a las NMNAT de gran interés respecto a la búsqueda de blancos terapéuticos; dada su ubiquidad y baja conservación estructural entre distintos organismos. En *Mycobacterium tuberculosis* el agotamiento de los niveles de NAD(P)<sup>+</sup> o la acumulación de intermediarios de sus ruta de síntesis, como el ácido quinolínico o los mononucleótidos de niacina, son tóxicos para la célula; lo que convierte a la NMNAT en un prometedor blanco de futuros antibióticos (Bi, Wang, and Xie 2011). Varios inhibidores de enzimas clave en la biosíntesis del NAD<sup>+</sup> se encuentran en fase de prueba para *B. subtilis* y *M. tuberculosis* (Bi, Wang, and Xie 2011; Jayaram, Kusumanchi, and Yalowitz 2011). Varios de estos inhibidores, impiden selectivamente el crecimiento microbiano (Jayaram, Kusumanchi, and Yalowitz 2011). En humanos, las NMNAT se consideran un blanco farmacológico de amplio espectro; teniendo en cuenta que pueden actuar como chaperonas para proteger contra la neurodegeneración y se correlacionan con síntesis

ADN durante el ciclo celular, participando en su reparación (Bi, Wang, and Xie 2011; Jayaram, Kusumanchi, and Yalowitz 2011). Las NMNAT también catalizan la conversión metabólica de potentes pro-fármacos antitumorales, como la tiazofurina y el ribósido de benzamida, a sus formas activas que son análogos de  $\text{NAD}^+$ . Estos dinucleótidos inhiben la Inosina-5'-mono-fosfato deshidrogenasa (IMPH), por lo que son utilizados ampliamente como antibióticos, agentes inmunosupresores y agentes anti-cáncer (Jayaram, Kusumanchi, and Yalowitz 2011).

Teniendo en cuenta el potencial terapéutico que ofrece la síntesis del  $\text{NAD}^+$ , nuestro grupo de investigación se ha enfocado en el estudio de esta ruta metabólica en distintos protozoos parásitos. Esto ha fructificado en la identificación de dos NMNAT en *Giardia lamblia*, una NMNAT en *Plasmodium falciparum* y una NMNAT en *Leishmania brasiliensis*, que constituyen el primer acercamiento al metabolismo del  $\text{NAD}^+$  en protozoarios parásitos (Buitrago-Gutiérrez and Ramirez-Hernandez 2009; Contreras and Ramirez-Hernandez 2010; Marín-Mogollón and Ramirez 2010).

El trabajo presentado, que consiste en la identificación y caracterización de la NMNAT de *Trypanosoma cruzi* (TcNMNAT), constituye un primer paso para estudiar el metabolismo del  $\text{NAD}^+$  en *Trypanosoma cruzi*, y un primer acercamiento en la comprensión de la síntesis de  $\text{NAD}^+$  en tripanosomátidos. Esto representa un avance importante hacia la dilucidación de cómo funciona y como se podría relacionar la síntesis del  $\text{NAD}^+$  con otros procesos celulares en este parásito; promoviendo así la identificación de nuevos blancos farmacológicos, y en consecuencia el desarrollo de mejores estrategias para el control de la etapa crónica de la enfermedad de Chagas. De igual forma este trabajo realiza nuevos aportes al conocimiento del metabolismo del  $\text{NAD}^+$  en parásitos intracelulares.



## II. Hipótesis de trabajo.

Teniendo en consideración la ubiquidad e importancia del  $\text{NAD}^+$  como cofactor y como sustrato, Junto con el rol central que desempeña la NMNAT en todas las rutas de biosíntesis del  $\text{NAD}^+$ , Debe existir por lo menos una isoenzima funcional perteneciente a la familia de las NMNAT en *Trypanosoma cruzi*.

## III. Objetivo general.

Estudiar el metabolismo del  $\text{NAD}^+$  de *Trypanosoma cruzi* mediante la identificación y caracterización de la TcNMNAT, una enzima fundamental en el metabolismo de este organismo.

## IV. Objetivos específicos.

- Clonar y expresar una proteína recombinante de la NMNAT de *T. cruzi* en el sistema de expresión heterólogo *Escherichia coli*.
- Caracterizar la actividad enzimática la(s) NMNAT de *T. cruzi*.
- Realizar una búsqueda bioinformática en aras de la identificación de secuencias candidato a la NMNAT de *T. cruzi*.
- Realizar un estudio *in silico* de la proteína identificada a fin de predecir sus características estructurales y establecer comparativos con sus homólogos humanos.



# 1. Procedimientos metodológicos.

En este apartado se mencionan y describen los materiales y métodos empleados en la identificación y caracterización de la TcNMNAT de *Trypanosoma cruzi*. Tales estrategias se presentan mediante dos aproximaciones: (1) Aproximación bioinformática: esta comprende la búsqueda de candidatos a NMNAT en *T. cruzi* y la realización de un estudio *in silico* de la estructura de la TcNMNAT identificada, así como su comparación con los respectivos homólogos humanos. (2) Aproximación experimental: en esta se efectúan la clonación, expresión y caracterización enzimática de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT. De igual manera se describe la metodología utilizada para proponer un mutante deletional de la TcNMNAT, tras haber confirmado previamente la identidad de tal enzima.

## 1.1 Aproximación bioinformática.

### 1.1.1 Identificación bioinformática de la TcNMNAT.

Para la obtención de secuencias candidato, se comenzó con la búsqueda de secuencias hipotéticas mediante la herramienta *Nucleotide* del NCBI (Geer et al. 2010). Con los candidatos encontrados se realizaron alineamientos entre las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de estos, mediante los programas MUSCLE (Edgar 2004) y CLUSTAL *Omega* (Sievers et al. 2011). Posteriormente se realizaron búsquedas con estas secuencias por medio de tBASTn, mediante la base de datos TritrypDB (Aslett et al. 2010) en los genomas de las cepas disponibles de la especie *Trypanosoma cruzi*. Los alineamientos resultantes se visualizaron mediante el programa CLC *Sequence Viewer* (v6.9) (CLC bio. Aarhus, Dinamarca).

### 1.1.2 Análisis bioinformático estructural de la TcNMNAT.

Inicialmente se realizaron análisis de estructura primaria, secundaria y terciaria para uno de los candidatos a TcNMNAT de *T. cruzi*. Para el análisis de la estructura primaria se utilizó la herramienta *ProtParam* del servidor web ExPASy (Gasteiger et al. 2005), donde se obtuvieron predicciones sobre distintos aspectos físico-químicos de la proteína hipotética. Por otra parte, la búsqueda de motivos y dominios se efectuó mediante las bases de datos *Conserved Domain Database* del NCBI (Marchler-Bauer et al. 2013) y *Pfam* (Finn et al. 2006). Las predicciones de estructura secundaria se generaron en los siguientes algoritmos del servidor web *Network Protein Sequence Analysis* (NPS@) (Combet et al. 2000): GORIV (Garnier et al. 1996), PHD (Rost and Sander 1993) y PREDATOR (Frishman and Argos 1996).

Los modelos de estructura terciaria se realizaron mediante el servidor I-TASSER (Roy, Kucukural, and Zhang 2010; Roy, Yang, and Zhang 2012; Y. Zhang 2008). De este servidor se tuvo en cuenta: el mejor modelo tridimensional generado y los términos de ontología genética (GO terms). Además de este servidor se tomaron las predicciones de código EC, mejores homólogos estructurales, y mejores análogos estructurales, generados por las herramientas COFACTOR (Roy, Yang, and Zhang 2012), y TM-align (Y. Zhang and Skolnick 2005). La visualización de los modelos obtenidos y sus respectivas superposiciones, se llevó a cabo gracias al programa *UCSF Chimera v1.8* (Pettersen et al. 2004).

Los alineamientos estructurales se realizaron mediante la herramienta *Matchmaker* del programa *UCSF Chimera v1.8* (Pettersen et al. 2004) y mediante el servidor DALI (Holm and Rosenström 2010). La superposición de modelos en el alineamiento se llevó a cabo gracias al programa *UCSF Chimera v1.8* (Pettersen et al. 2004). Para el refinamiento de los modelos se llevaron a cabo minimizaciones de energía gracias al programa *UCSF Chimera v1.8* (Pettersen et al. 2004), con pasos de minimización de un tamaño de 0,02 angstroms. Los modelos minimizados posteriormente se evaluaron mediante el servidor RAMPAGE (*Ramachandran Plot Assessment*) (Lovell and Davis 2003).

## 1.2 Aproximación Experimental.

### 1.2.1 Clonación de la Tcnmnat.

- ***Diseño de cebadores para amplificar la nmnat de T. cruzi.***

Habiendo corroborado que los dos candidatos encontrados en la sección anterior (candidato 1 GI: 322828790, candidato 2 GI: 71655647) correspondían a un mismo locus en el genoma de *T. cruzi*, se diseñaron 3 cebadores distintos (Tabla 1-1). Uno para el extremo 5' (idéntico en ambas secuencias putativas) y dos para el extremo 3'; dados ciertos polimorfismos en las secuencias de nucleótidos halladas. En el cebador directo se adicionó la secuencia accesoria 5'-CACC-3' para la correcta ligación al vector de expresión pET-100 D-TOPO (Invitrogen) (Dieffenbach, Lowe, and Dveksler 1993). El diseño mencionado contempló un *Tm* teórico de 58°C para todos los cebadores.

**Tabla 1-1. Secuencias de los cebadores para amplificar un posible ORF de la TcNMNAT.** Se observan las secuencias y nombres de los cebadores diseñados.

Cebador	Secuencia
TcF (Extremo 5')	5'-CACCATGAGCGATGACACA-3'
TcR1 (Extremo 5')	5'-TCAACAATTTTGAGTATTGTTTG-3'
TcR2 (Extremo 5')	5'-TCAATAATTTTGAGTATTGTTTG-3'

- **Amplificación de la *Tcnmnat* por PCR.**

La extracción de ADN genómico se realizó por el método de fenol cloroformo (Pereira et al. 2000) A partir de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cultivados *in vitro*, en medio *Schneider* suplementado con suero fetal bovino al 10% (V/V) (Baker and Price 1973; Miralles et al. 2002). La amplificación del fragmento se llevó a cabo tomando los cebadores TcF y TcR1, mediante PCR (Dieffenbach, Lowe, and Dveksler 1993). La amplificación a partir de ADN genómico se realizó utilizando el sistema *Platinum® PCR supermix high fidelity* (invitrogen). Cada reacción constó de: 22,5µL de *Buffer Platinum®* 10x (contiene *Taq-polimerasa*, *Pfu-polimerasa*, dNTPs, Mg<sup>2+</sup> y anti-tag), 1µL de plantilla (ADN genómico 200ng/µL), 0,5µL de cebador TcF (10uM), 0,5µL de cebador TcR1 (10uM) y 0,5µL de agua-dietilpirocarbonato (DEPC). El perfil térmico tuvo una denaturación inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de denaturación, anillamiento y extensión, donde cada uno constó de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C; seguido de una extensión de 10 minutos a 72°C. Los resultados se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% detectando con bromuro de etidio (Sambrook and Russell 2006).

Para obtener un amplificado de la *Tcnmnat* apto de ser ligado en el vector de expresión pET-100 D-TOPO, se realizó una primera amplificación a partir de ADN genómico, mediante el sistema *Platinum® PCR supermix high fidelity* (invitrogen). Posteriormente el amplificado, producto del anterior proceso, fue sujeto de una re-amplificación mediante el sistema *Pfu ADN polimerasa* (Fermentas). En el caso del primer sistema, la composición de la reacción y el perfil térmico empleado fueron los mismos utilizados en la PCR del párrafo anterior. Con el sistema *Pfu ADN polimerasa* se utilizó 1µL de plantilla (Producto de PCR), 2,5µL de *Buffer* de reacción 10X, 2,5µL de MgSO<sub>4</sub> (25mM), 0,5µL de dNTPs (10mM), 0,5µL de cebador TcF (10uM), 0,5µL de cebador TcR1 (10uM), 0,5µL de *Pfu* polimerasa y se completó a 25µL con agua tratada con DEPC. Para la amplificación se ejecutó un perfil térmico con una denaturación inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de denaturación, anillamiento y extensión, donde cada uno constó de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C y 2 minutos a 72°C; seguido de una extensión de 10 minutos a 72°C. Los resultados se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, con visualización por bromuro de etidio (Sambrook and Russell 2006).

---

- **Clonación del Vector recombinante pET-100/Tcn<sup>r</sup>nat.**

En primera instancia se realizó la ligación directa del producto de PCR al vector pET100 D-TOPO (Invitrogen). Para ello se utilizaron aproximadamente 12,1ng (4μL), de amplificado según mediciones por densitometría, junto con 1μL de vector y 1μL de *buffer*. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 22°C. El producto de ligación se transformó en células químicamente competentes de la cepa de mantenimiento *Escherichia coli* TOP10, mediante choque térmico. Para ello se mezclaron 50μL de células químicamente competentes de *E. coli* TOP10 con 3μL de reacción de ligación. Se incubaron por 30 minutos sobre hielo, para luego someterlas a 42°C por 30 segundos, e inmediatamente pasarlas a incubación sobre hielo por 2 minutos. Posteriormente se le agregaron 250μL de medio de cultivo *Luria-Bertani* (Lb) y se incubó a 37°C durante una hora. La mezcla se plateó sobre medio sólido Lb con ampicilina (100μg/mL). Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Los clones transformados se verificaron mediante PCR utilizando como plantilla la colonia transformada, suspendida en 40μL de agua-dietilpirocarbonato (DEPC) (Sambrook and Russell 2006). Para ello se hizo uso de la *Taq* DNA polimerasa (purificada del vector-pTTQ18). En este último caso, los cebadores, la composición de la reacción y el perfil térmico fueron idénticos a los mostrados para la *Pfu* ADN polimerasa (fermentas); excepto por la cantidad de *Taq* polimerasa, que fue de 1μL/reacción.

De los clones positivos se realizaron inóculos de 10mL en medio líquido Lb con ampicilina (100μg/mL), para luego realizar la extracción del plásmido mediante lisis alcalina/fenol-cloroformo; tomando como base las siguientes metodologías (Birboim and Doly 1979; Birnboim 1983; He, Wilde, and Kaderbhai 1990). Para esto, se centrifugaron los inóculos a 6000rpm por 10 minutos. Los pellets resultantes se mezclaron inicialmente con 300μL de solución de re-suspensión, compuesta de Glucosa 50mM, tris(hidroximetil)aminometano (tris)-HCl 25mM y ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 25mM pH 8.0. Tras re-suspender el pellet se mezclaron 300μL de solución de lisis (NaOH 0.2N, dodecilsulfato sódico SDS 1%) y después de agitar 10 veces por inversión e incubarlo por 5 minutos sobre hielo se mezclaron 300μL de solución de neutralización (Acetato potásico 3M pH 4.8). La mezcla resultante se centrifugó a 10000rpm durante 10 minutos a 4°C y se le extrajo el sobrenadante; este se incubó con 2μL de RNasa A durante 30 minutos a 37°C. Tras la incubación se le agregó a la mezcla Fenol: Cloroformo (relación de volumen 1:1) y se incubó a 4°C por 10 minutos; agitando

por inversión cada 2 minutos. Luego se centrifugó de nuevo a 12000rpm por 5 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante (fase acuosa). A dicho sobrenadante se le agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío junto con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2; luego se mezcló por inversión y se incubó una hora a -20°C, tras lo cual se centrifugó a 12000rpm 10 minutos a 4°C. En seguida se realizaron dos lavados con 1mL de etanol al 70%, centrifugando en cada lavado a 12000rpm por 5 minutos. Tras la centrifugación se retiró el sobrenadante y se secó el pellet resultante a 37°C por 10 minutos. Dicho pellet se suspendió en agua DEPC. La verificación del inserto en los vectores extraídos se confirmó mediante la amplificación por PCR, así como por perfiles de digestión del plásmido, con la enzima de restricción EcoRV (Fermentas).

La verificación por PCR se llevó a cabo usando el plásmido extraído como plantilla. Para esto se utilizó la *Taq* polimerasa (purificada del vector-pTTQ18). Los cebadores, la composición de la reacción y el perfil térmico fueron idénticos a los mostrados para la amplificación donde se utilizó *Pfu ADN polimerasa* (fermentas); excepto por la cantidad de *Taq* polimerasa, que fue de 1µL/reacción. Los perfiles de digestión del plásmido con la enzima de restricción EcoRV (Fermentas), se obtuvieron mezclando 0,5µL de plásmido, 0,5µL de enzima, 1µL de *buffer* de reacción y completando a 10µL con agua DEPC. La mezcla se incubó toda la noche a 37°C. La visualización de las amplificaciones y digestiones en todos los casos se realizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa, al 1% para la amplificación por PCR y a 0,8% en el caso de la digestión. En todos los casos se visualizó con bromuro de etidio (Sambrook and Russell 2006). Los clones obtenidos, pET-100/Tcnmnat en *E. coli* cepa TOP10, tras su evaluación fueron crio-preservados en medio Lb con glicerol al 40%; a -80°C.



### 1.2.2 Expresión de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT.

- ***Obtención de Células competentes.***

Se realizaron inóculos líquidos con células de las cepas de expresión BL21 (DE3) y BL21-CodonPlus (DE3)-RIL. Estos inóculos se incubaron toda la noche a 37°C con agitación vigorosa en medio Lb con cloranfenicol (34µg/mL), en el caso de la cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (a fin de mantener la selección sobre el plásmido que contiene copias extra de tRNA para codones raros), o solo en medio Lb para la cepa BL21 (DE3). A continuación se realizó una dilución 1:10 de cada inóculo en su respectivo medio, y se incubó a 37°C hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> entre 0.3- 0.4. Cada cultivo se centrifugó a 3500rpm a 4°C por 10 min; tras lo cual se descartó el sobrenadante. El pellet restante se re-suspendió en 800µL de cloruro de calcio (50mM); manteniendo la mezcla sobre hielo. A continuación se volvió a centrifugar, recuperando de nuevo el pellet, el cual se re-suspendió nuevamente en la solución de cloruro de calcio; se centrifugó otra vez y se reiteró el procedimiento dos veces más. El pellet obtenido en el último paso fue re-suspendido en 500µL de CaCl<sub>2</sub> y 200µL de glicerol al 100%. La mezcla se crio-conservó en alícuotas de 50µl para su posterior uso a -80°C. Este procedimiento fue modificado de la siguiente metodología (Mandel and Higa 1970).

- ***Transformación en cepas de expresión de E. coli e Inducción de la expresión de la 6xHisTcNMNAT.***

Se transformaron células de *E. coli* cepa BL21 (DE3) o BL21-CodonPlus (DE3)-RIL con el vector pET-100/Tcnnat, por medio de choque térmico, mediante procedimiento mencionado con anterioridad (sección 1.2.1). Con los clones transformados se realizaron inóculos líquidos usando medio Lb con cloranfenicol (34µg/mL) y ampicilina (100µg/mL) en el caso de la cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, o medio Lb con ampicilina (100µg/mL) para la cepa BL21 (DE3). Estos inóculos se incubaron toda la noche a 37°C en agitación

constante. Seguidamente se realizaron diluciones 1:50 con los inóculos en su respectivo medio, según el caso. Posteriormente se continuaron incubando las diluciones a 37°C en agitación y justo tras haber alcanzado una OD<sub>600</sub> de 0,6, se indujo la expresión de la proteína recombinante con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (1mM), adicionándolo en el medio líquido de selección. En este estado se continuó la incubación a 37°C en agitación durante toda la noche o se tomaron alícuotas del cultivo a distintos tiempos de inducción, de acuerdo con el experimento a llevar a cabo. Pasado el tiempo de inducción, el cultivo fue centrifugado a 8500rpm por 15 minutos a 4°C; descartando el sobrenadante y conservando el pellet (células totales).

En los experimentos relacionados con la optimización de la expresión de la 6xHisTcNMNAT y su purificación, se realizaron ciertas modificaciones en cuanto al protocolo de inducción, Tales modificaciones incluyen:

- Incubación del cultivo a temperatura ambiente, tras la inducción.
  - Disminución de las concentraciones de inductor (0,5mM de IPTG),
  - Aumento de la densidad óptica (OD<sub>600</sub>) del cultivo, previa a la adición del inductor (0,7).
- 
- ***Obtención de fracciones proteicas a partir del sistema de expresión pET-100/Tcnnat en E. coli.***

Las células totales de cultivos inducidos fueron lisadas por medio de choque térmico o maceración en nitrógeno líquido según el volumen del cultivo. Para ello se centrifugaron los cultivos post-inducción a 6000rpm 10 minutos a 4°C. Los pellets resultantes se suspendieron en *buffer* de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 10mM pH 8.0) usando una relación de 5mL/g. Posteriormente se adicionaron a la mezcla: Inhibidores de proteasas (Sigma P8340) con una relación 1/200 respecto al volumen de *buffer* de lisis (concentración final: 1mM AEBSF, 14μM E64, 15μM Pepstatin A, 40μM Bestatin, 20μM Leupeptin, 0,8μM Aprotinin), RNasa relación 1/200 (concentración final: 6,25μg/mL) y lisozima (10mg/mL); relación 1/10 (concentración final 1mg/mL). La mezcla resultante se dejó incubar por 30 minutos sobre hielo. Luego, se realizaron 10 ciclos de

choque térmico (preparaciones pequeñas) o se maceró por nitrógeno líquido según el caso. En cada ciclo de choque térmico se incubaron los viales con alícuotas de la mezcla, en nitrógeno líquido durante 8 segundos e inmediatamente se pasó a incubar a 37°C durante 30 segundos; o hasta que se descongelara la mezcla. Cada tres ciclos de choque térmico se homogeneizó la mezcla por agitación por *vortex*. Para maceración por nitrógeno líquido, sobre la mezcla en un mortero se vertió el nitrógeno (hasta que el volumen del nitrógeno cubriese totalmente la muestra), tras lo cual se maceraba hasta homogeneidad. Dicho proceso se repetía tres veces. Ulteriormente, y para ambos procedimientos, la muestra se centrifugó a 12000rpm por 20 minutos a 4°C; retirando cuidadosamente el sobrenadante y almacenando el pellet (fracción insoluble) a -20°C. El sobrenadante se pasó por una jeringa diez veces, y seguidamente se volvió a centrifugar bajo las condiciones mencionadas; tomando de nuevo el sobrenadante (fracción soluble) y descartando el pellet restante (fracción insoluble).

Para la optimización de la purificación de la 6xHisTcNMNAT por cromatografía de afinidad, se realizaron ciertas modificaciones al protocolo de lisis mencionado. Tales modificaciones incluyen:

- Variación de la relación volumen inicial de cultivo/ volumen de *buffer* de lisis. Las lisis realizadas en función de una relación de peso volumen (5mg/mL) corresponden a un factor de concentración de alrededor de 50 veces. Esta relación se aumentó a 70 veces, lo cual implicó utilizar menores cantidades de *buffer* de lisis en función del volumen inicial de cultivo líquido inducido.
- Implementación de la sonicación como complemento para la maceración por nitrógeno líquido. Previendo el riesgo de una lisis incompleta dados los altos factores de concentración (70 veces), se sometió la mezcla de lisis a un proceso de sonicación previo a la maceración por nitrógeno líquido. Dicho proceso se realizó con 10 pulsos de 45 segundos, dejando 20 segundos de intervalo entre pulsos. Todo esto se realizó sobre hielo, para así reducir el deterioro de la proteína.

- **Co-expresión de chaperonas con la 6xHisTcNMNAT.**

Para la construcción del sistema de co-expresión se transformaron 50µL de células competentes BL21 (DE3) por choque térmico con 1µL del plásmido pTf16 (*Takara*) que codifica para la chaperona *Triger factor*. El extendido de las células se llevó a cabo en placas de agar Lb suplementado con cloranfenicol (50µg/mL) y se dejó creciendo toda la noche a 37°C. Con una de las colonias resultantes de la transformación, se realizó un inóculo líquido en el mismo medio para preparar a partir de este, células competentes; tal y como se describe en el primer apartado de esta sección. Posteriormente se re-transformaron 50µL de tales células competentes por choque térmico con 1µL ADN plasmídico de pET100/ TcNMNAT purificado. Las células post-transformación se extendieron en placas de agar Lb suplementado con ampicilina (100µg/mL) y cloranfenicol (50µg/mL), tras lo cual se dejaron creciendo toda la noche a 37°C.

La expresión de las proteínas recombinantes en el sistema de co-expresión, se efectuó mediante la adición de los respectivos inductores para la 6xHisTcNMNAT y/o la chaperona *Factor trigger* (IPTG y L-arabinosa respectivamente) dependiendo del tratamiento a evaluar. El procedimiento se detalla a continuación.

Partiendo de una colonia transformada con el plásmido de expresión de chaperonas y el plásmido recombinante, se realizó un inóculo líquido en medio LB con ampicilina (100µg/ml), cloranfenicol (50µg/mL) y glucosa al 1%; el cual se dejó creciendo toda la noche a 37°C. El día siguiente se realizó una dilución del cultivo 1:50 en el mismo medio (Lb con ampicilina y cloranfenicol) pero esta vez suplementado con el inductor de la chaperona (L-arabinosa 1mg/mL). Paralelamente se realizó una segunda dilución del inóculo 1:50 en el mismo medio, pero sin adicionar el inductor de la chaperona *Factor trigger* (L-arabinosa). En ambos casos se suplementaron los medios con glucosa al 1%. Ambas diluciones se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,6. Al llegar a este punto se separaron en dos alícuotas: aquellas a las cuales se les induciría la expresión de la 6xHisTcNMNAT (muestras inducidas) y aquellas no-inducidas (muestras control). A las muestras inducidas se les adicionó IPTG (1mM) a fin de inducir la proteína recombinante. No obstante todas las muestras (inducidas y no-inducidas) se incubaron a 37°C con agitación constante, toda la noche. Finalizada la inducción se centrifugaron los cuatro cultivos a 6000rpm por 10 minutos a 4°C, descartando el

sobrenadante. Con los pellets de células totales obtenidos se realizó la respectiva lisis para obtener la fracción proteica soluble e insoluble de las mismas (sección 1.2.2).

- ***Detección de las proteínas recombinantes por electroforesis SDS-PAGE y Western blot.***

Los cultivos de células totales, junto con sus respectivos sobrenadantes y pellets, se analizaron por separado para detectar la presencia de la proteína recombinante inducida en los diferentes experimentos. Para ello dichas fracciones totales, solubles e insolubles de los clones inducidos, se evaluaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) y por ensayos de Western blot. Para la realización de los SDS-PAGE las alícuotas de la fracción correspondiente se re-suspendieron en *buffer* de carga para electroforesis (concentración final: Tris 0,083M, SDS 1,74% (p/v), Glicerol 5% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5,5% (v/v) y Azul de bromofenol 0,002% (p/v)). Las muestras se calentaron a 92°C por 10 minutos y luego se cargaron 10 $\mu$ l de la muestra en un gel de acrilamida discontinuo, con un gel concentrador del 3,9% (*buffer* concentrador: Tris 0,125M pH 6,8 SDS 0,1% (p/v)) y un gel separador: 12% o 10% según el experimento (*buffer* separador: Tris 0,375M pH 8,8 SDS 0,1% (p/v)). La separación electroforética se llevó a cabo manteniendo una diferencia de potencial de 108V en *buffer* de corrida Tris-Glicina (Tris 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1% (p/v)). La visualización de las bandas se logró mediante tinción del gel en solución de azul de Coomassie (Azul de Coomassie R250 0,05% (p/v), isopropanol 25% (v/v), ácido acético 11,2% (v/v)) El procedimiento se efectuó con base en las siguientes metodologías (Brunelle and Green 2014; LAEMMLI 1970).

En los ensayos de inmunodetección (Western blot) las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, usando el método de electro-transferencia húmeda (Towbin, Staehelin, and Gordon 1979). En este proceso se utilizó *buffer* de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol 10% V/V, pH 8,3) aplicando 200mA por 2 horas o 20mA durante toda la noche. La membrana de nitrocelulosa y el gel a transferir se equilibraron en *buffer* de transferencia antes de realizar la electro-transferencia. Para detectar la proteína recombinante se empleó el sistema Biotina-estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano

(Fra et al. 1995; Ramprasad et al. 1996) según el experimento. Para la ejecución de sistema Biotina-estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina primero se bloqueó la membrana por una hora en buffer TBST-L (leche 5%, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween 20 0,1% V/V). Luego, se incubó durante una hora con anticuerpo primario monoclonal de ratón, contra la etiqueta de histidinas propia de las proteínas recombinantes expresadas por el vector pET100. Dicho anticuerpo se encontraba en TBST (1:5000). A continuación se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBST-L y seguidamente se incubó durante una hora con el anticuerpo secundario biotinilado, anti-IgG de ratón, en TBST (1:5000). Posteriormente se realizaron de nuevo tres lavados de 10 minutos con TBST-L y se incubó la membrana durante 30 minutos con estreptavidina-fosfatasa alcalina en TBST (1:3000). Se lavó luego durante 10 minutos, tres veces, con TBST y se procedió con el revelado de la membrana. Para esto se utilizaron los sustratos cromogénicos NBCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate p-Toluidine Salt, S381C, Promega) y NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride, S380C, Promega) en el buffer de reacción (Tris-HCl 100 mM pH 9,0, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM). La detección inmunológica se detuvo con agua destilada cuando se evidenciaron productos coloreados sobre la membrana.

Para la detección de la proteína recombinante por el sistema de Peroxidasa de rábano, en primera instancia se bloqueó la membrana por una hora en buffer TBS-L (leche 5%, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM). A continuación, se incubó durante una hora con anticuerpo monoclonal primario anti-histidinas de ratón, en TBS (1:5000). Luego se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-L y en seguida se incubó durante dos horas con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano en TBS (1:3000). Seguidamente se repitieron los tres lavados de 10 minutos con TBS-L para luego proceder con el revelado de la membrana. En este paso se utilizó TBS, 4-Cloro-Naftol y peróxido de hidrógeno. Tan pronto como se evidenciaron productos coloreados sobre la membrana se detuvo la reacción de revelado con agua destilada.

Los procedimientos de SDS-PAGE y Western blot mencionados, también se utilizaron en la visualización de las distintas fracciones y eluidos propios de las estrategias de purificación empleadas.

### 1.2.3 Purificación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT.

- ***Cromatografía de afinidad a Ni-NTA.***

La fracción soluble de cultivos E. coli BL21 (DE3) pET-100/Tcnnat inducidos se purificó parcialmente utilizando cromatografía de afinidad a níquel. Para esto se empleó resina de níquel y ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) como fase estacionaria y como fase móvil Buffer de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM pH 8,0), con distintas concentraciones de imidazol para las etapas de unión a la resina, lavado y elución; según las instrucciones del fabricante (Quiagen). Inicialmente, se tomaron 100uL de resina en suspensión por cada mL de fracción soluble utilizada. Dicho volumen de resina se centrifugó a 4000rpm por 3 minutos, descartando el sobrenadante. Esta resina se activó con 2 lavados con buffer de unión (buffer de lisis con Imidazol 10mM pH 8,0) usando tres veces el volumen inicial de resina y centrifugando a 4000rpm por 3 minutos. Habiendo descartado el buffer de unión se adicionó el volumen correspondiente de la fracción proteica soluble, para incubar sobre hielo, en agitación toda la noche. Seguidamente se centrifugó a 4000rpm por 5 minutos y se tomó el sobrenadante (las proteínas no unidas a la resina). Posteriormente se realizaron varios lavados, cada uno con 1mL con buffer de lavado (Buffer de lisis con Imidazol 20mM pH 8,0), hasta alcanzar una densidad óptica constante a 280nm (menor a 0,05). Cada lavado se realizó mezclando por inversión 10 veces y centrifugando a 5200rpm por dos minutos. Por último, se realizaron 4 eluciones con el respectivo buffer (buffer de lisis con Imidazol 250mM pH 8,0), usando el volumen inicial de la resina en suspensión. La primera elución se incubó con la resina sobre hielo en agitación durante toda la noche; las eluciones restantes se incubaron una hora cada una. La purificación se observó mediante SDS-PAGE y Western blot, usando las proteínas no unidas a la resina, lavados y eluciones colectadas.

Por otra parte también se realizaron cromatografías de afinidad con esquemas de elución escalonada. El protocolo en estos casos fue prácticamente el mismo, con ciertas modificaciones mencionadas a continuación:

- *Utilización del mismo buffer para la unión de las proteínas a la resina y los lavados de esta última.* Para este tipo de cromatografías se unió y se lavó con el *buffer* de unión; el cual consta de *buffer* de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM pH 8,0) suplementado con 10mM de imidazol.
- *Utilización de distintos buffers de elución.* En los esquemas de elución escalonada se utilizaron distintas concentraciones de imidazol en el *buffer* de lisis, de acuerdo con lo requerido por cada experimento. En resumen se utilizaron concentraciones de 50mM, 75mM, 100mM, 160mM, 200mM y 250mM de imidazol.
- ***Purificación por cromatografía de filtración en Gel.***

La fracción soluble de cultivos E. coli BL21 (DE3) pET-100/Tcnmnat inducidos se purificó parcialmente mediante cromatografía de filtración en gel, empleando resina sephadex G-75 superfina (rango de fraccionamiento 3000-80000 Da) como fase estacionaria, en una columna de 18cm con un volumen total de 23mL. Como fase móvil se usaron 300mL de buffer de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 10mM pH 8,0), los cuales fueron filtrados con un tamaño de poro de 0,45µm. Para preparar la fase estacionaria se hincharon 1.333 gramos de resina seca en 20mL de agua destilada (12-15mL/g). Previamente se excluyeron las partículas ultra-finas mediante la adición 40mL de agua y decantando toda la noche, para luego realizar 5 lavados con 40mL de agua a 70-90°C. En cada lavado se re-suspendió la resina para luego retirar el sobrenadante tras decantar por 5 minutos. Para el empaque de la columna, Inicialmente se lavaron, la columna de vidrio y las cánulas con buffer de lisis, usando un flujo de 6,4mL/min durante 5 minutos. Luego se adicionaron 3mL de buffer de lisis a la columna con la llave cerrada, se homogeneizó la resina y se adicionaron 13mL de esta en un solo paso. La resina se dejó en reposo por 5 minutos tras lo cual, con la llave de flujo abierta, se mantuvo con un flujo de 0,25mL/min durante dos horas media. Así se obtuvo una altura constante de lecho de empacado de 15,7 cm. Finalmente se equilibró la fase estacionaria con buffer de lisis pasando aproximadamente tres volúmenes (60mL) de buffer a través de la columna. La calidad del empacamiento de la resina y el volumen muerto se determinaron mediante la



adición de 260uL solución de azul de dextrán (polímero de anhidroglucosa) a 2mg/mL (buffer Tris-HCl pH 7.5, 50 mM. KCl 100mM). El volumen muerto medido fue de 4,5mL. Para la aplicación de la muestra se adicionaron 260uL de sobrenadante. Se recogieron 50 fracciones de 250uL (5 gotas). Las fracciones fueron cuantificadas por absorbancia a 280nm. Todas se almacenaron a -20°C. Para la evaluación de las muestras por SDS-PAGE y Western blot, inicialmente realizaron 5 mezclas de 10 fracciones cada una (30uL por fracción para un total de 300uL). A cada mezcla se le adicionaron 3 volúmenes de acetona fría (900uL), mezclando muy bien e incubando a -20°C durante toda la noche. Luego se centrifugaron a 12000rpm por 10 minutos a 4°C. Acto seguido se lavó el pellet con 1mL de etanol al 70% frío, para luego centrifugarlo a 12000rpm por 10 minutos a 4°C. Se dejó secar el pellet y se re-suspendió en 60uL de buffer de carga 1X para SDS-PAGE; habiendo concentrado la muestra alrededor de 6 veces. Las fracciones individuales seleccionadas fueron sujeto del mismo procedimiento realizado en las mezclas. La visualización de éstas se efectuó por SDS-PAGE y Western blot.

- ***Precipitación con sulfato de amonio.***

Inicialmente se determinó la concentración de sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a la cual se precipita la 6xHisTcNMNAT, utilizando concentraciones crecientes de la sal. Para ello a las fracciones solubles de cultivos *E. coli* BL21 (DE3) pET-100/Tcnmnat inducidos se les adicionó una determinada cantidad de Sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La mezcla se incubó sobre hielo toda la noche con agitación. Posteriormente esta se centrifugó a 10000rpm a 4°C por 10 minutos y se separó el pellet del sobrenadante. Estos experimentos fueron monitoreados por SDS-PAGE y *Western blot*.

Una vez establecida la concentración de sulfato de amonio a la cual precipita la TcNMNAT (20%) el pellet de la precipitación se re-suspendió en *buffer* de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 10mM pH 8.0) utilizando la mitad del volumen original del sobrenadante inicial. A continuación esta nueva mezcla se dializó contra 900mL de *buffer* de lisis (mediante 2 cambios de 450mL) a fin de retirar el sulfato de amonio presente en la solución. La fracción dializada resultante se acopló a una cromatografía de afinidad bajo las condiciones previamente mencionadas (sección 1.2.3). La fracción dializada y las fracciones correspondientes a la cromatografía de afinidad a la que se acopló, se analizaron por medio de SDS-PAGE y Western blot.

## 1.2.4 Ensayos enzimáticos.

- ***Ensayos enzimáticos directos.***

La actividad enzimática de las proteínas recombinantes purificadas parcialmente se determinó mediante ensayos enzimáticos directos. La mezcla de reacción (HEPES/KOH pH 7.4 25mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, ATP 1mM, NMN 1mM o NAMN 1mM) se incubó a 37°C durante 5 minutos y se inició la reacción enzimática al adicionar 5µg de las muestras a evaluar. Inicialmente los ensayos se ejecutaron en un volumen de 50µl a 37°C, durante 30min. La detención y neutralización de las reacciones se realizó empleando HClO<sub>4</sub> 1,2M y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M, respectivamente (Balducci, Emanuelli, and Raffaelli 1995; Monica Emanuelli et al. 1999). La separación de los analitos (50uL) se efectuó mediante RP-HPLC utilizando una columna C18 de 25cm de largo x 4.6mm de diámetro interno, con tamaño de partícula de 5µm (Phenomenex); operada en un equipo HPLC (Agilent Serie 1200). En dicha separación se aplicó el siguiente gradiente de elución con buffer de fosfatos (fosfato de potasio, pH 6.0, 0.1mM) y metanol: 8 minutos de buffer de fosfatos al 100%, 4 minutos para aumentar progresivamente la concentración de etanol al 20%, 2 minutos con buffer de fosfatos al 80% y metanol al 20% y 4 minutos para disminuir progresivamente la concentración de etanol al 0%; terminando con 2 minutos con buffer de fosfatos al 100%. Las separaciones se efectuaron a temperatura ambiente con un flujo de 1.5mL/min. La detección de los analitos se realizó a 254nm, teniendo en cuenta el tiempo de elución área bajo el pico, en comparación con el patrón apropiado (ATP, NMN y NAD<sup>+</sup>).

- ***Cuantificación de proteína.***

La concentración de proteínas se determinó mediante análisis por densitometría y/o el método de Bradford utilizando albumina sérica bovina (BSA) como patrón (Bradford 1976).

### **1.3 Generación *in silico* del mutante amino terminal de la TcNMNAT.**

Tras haber confirmado la identidad de la TcNMNAT y caracterizar su actividad mediante una aproximación experimental se propuso un mutante delecional de esta enzima. Para ello se realizaron alineamientos múltiples entre las secuencias de aminoácidos de las NMNAT de cepas disponibles de *T. cruzi* y las correspondientes isoenzimas humanas de la NMNAT gracias a los programas MUSCLE (Edgar 2004) y CLUSTAL *Omega* (Sievers et al. 2011). Las secuencias divergentes de interés, evidenciadas mediante dicho alineamiento, se sometieron a búsquedas de posibles motivos de modificación covalente mediante las herramientas bioinformáticas NetPhos 2.0 (Blom, Gammeltoft, and Brunak 1999), NetAcet 1.0 (Kiemer, Bendtsen, and Blom 2005) y GPS 2.1 (Xue et al. 2008). Eliminando dichas secuencias exclusivas, se generó la secuencia del respectivo mutante delecional, el cual fue sometido a los mismos análisis bioinformáticos estructurales que la TcNMNAT (sección 1.1.2). Adicionalmente se realizaron alineamientos estructurales entre los modelos de estructura terciaria del mutante y su versión nativa usando las herramientas mencionadas en la sección 1.1.2.



## 2.Resultados experimentales.

### 2.1 Aproximación bioinformática.

#### 2.1.1Búsqueda de secuencias candidato.

Con el objetivo de encontrar secuencias candidato para la NMNAT de *Trypanosoma cruzi*, se comenzó con la búsqueda de secuencias hipotéticas en la base de datos *Nucleotide* del NCBI (Geer et al. 2010). Dichas secuencias debían estar anotadas como isoenzimas pertenecientes a esta familia y como proteínas putativas de *T. cruzi*. Se encontraron dos posibles candidatos cuyas entradas para las secuencias de aminoácidos y sus respectivas regiones genómicas de origen, se encuentran en la tabla 2-1.

**Tabla 2-1. Candidatos a la NMNAT de *Trypanosoma cruzi*.** Bases de datos, entradas, y tamaños de las secuencias respectivas.

Candidato	Base de datos	Locus	Regiones de origen.	Proteína (aa)	ADN (pb)
1	<i>Genbank</i>	EFZ32462.1	ADWP01000734.1	289 aa	870 pb
2	<i>Refseq</i>	XP_816384.1	NW_001849567.1	289 aa	870 pb

En esta tabla se observan dos marcos de lectura putativos: el del candidato 1 (GI: 322828790) anotado en las bases de datos *Genbank* (Benson et al. 2005) y el del candidato 2 (GI: 71655647), anotado en la base de datos *Reference Sequence* (Pruitt et al. 2014). Cada uno de estos posibles genes codifica para una proteína de 289aa y 32kDa a partir de una región codificante (CDS) de 870 nucleótidos.

Posteriormente se realizaron alineamientos entre las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de estos dos candidatos, mediante los programas MUSCLE (Edgar 2004) y CLUSTAL *Omega* (Sievers et al. 2011). De esta forma se podría determinar si ambos

constituían un mismo marco de lectura. Los porcentajes de identidad arrojados por los programas de alineamiento se encuentran en la tabla 2-2. El alineamiento entre secuencias de aminoácidos muestra una identidad del 98,27% con cinco sustituciones, en tres de estas los aminoácidos son sustituidos por otros de propiedades similares (Anexo A). Esto es congruente con el alineamiento de las correspondientes secuencias de nucleótidos; en donde existe una identidad del 98,05% con un total de 18 sustituciones de nucleótidos (Anexo B). Dado que las pocas sustituciones de nucleótidos se reflejan en un número aún menor de sustituciones en la secuencia de aminoácidos, es muy probable que tales diferencias se deban a polimorfismos entre las cepas analizadas de esta especie de tripanosomátido, y en consecuencia constituyan un mismo marco de lectura.

**Tabla 2-2. Alineamientos entre candidatos a la NMNAT de *T. cruzi*.** Porcentajes de identidad entre los alineamientos de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de los dos candidatos a NMNAT de *T. cruzi*.

Herramienta bioinformática	Identidad proteína (%).	Identidad ADN (%).
CLUSTAL OMEGA	98.27	98.05
MUSCLE	98.27	98.05

Ya habiendo encontrado un posible candidato de una NMNAT en *T. cruzi* se procedió a verificar la existencia de este en el genoma de dicho tripanosomátido. Para ello se sometió la secuencia del candidato 2 a una búsqueda por medio de tBASTn, en la base de datos TritrypDB (Aslett et al. 2010) El resultado de esta búsqueda arrojó cuatro registros para genes candidatos anotados como isoenzimas NMNAT putativas (tabla 2-3). Estos registros pertenecen a distintas cepas de *Trypanosoma cruzi* y en general sus alineamientos constan de identidades entre 92% y el 100%. Es de destacar el marco de lectura TcCLB.507047.170 del genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener Esmeraldo-like, que arrojó un 100% de identidad en el alineamiento correspondiente con la secuencia candidato. En este caso la región genómica de origen para el gen encontrado es la misma que la del candidato 2. Para los cuatro registros encontrados se predijo una función biosintética (predicted GO process) y una actividad nucleotidil-transferasa

(predicted GO function). Estos resultados permiten concluir que existe un marco de lectura para una NMNAT putativa (TcNMNAT) en el genoma de *T. cruzi*.

**Tabla 2-3. Marcos de lectura de TcNMNAT putativas en *T. cruzi*.** Marcos de lectura para distintas cepas de *T. cruzi*, halladas mediante tBLASTn con la secuencia de aminoácidos del candidato 2 en la base de datos *TrtrypDB*.

TcNMNAT (Candidato 2)						
Gene ID	Organismo	Puntaje	E-Value	Secuencia genómica	Ubicación	Identidad alineamiento
TCSYLvio_008891	<i>T. cruzi</i> Sylvio X10/1	598	0,00E+00	ADWP02020923	12,533 – 13,402 (-)	285/288 (98%)
TcCLB.507047.170	<i>T. cruzi</i> CL Brener Esmeraldo-like	590	0,00E+00	TcChr17-S	188,592 – 189,461 (-)	289/289 (100%)
TcCLB.509179.80	<i>T. cruzi</i> CL Brener Non-Esmeraldo-like	586	0,00E+00	TcChr17-P	188,641 – 189,510 (-)	285/288 (98%)
Tc_MARK_7577	<i>T. cruzi</i> marinkellei strain B7	526	0,00E+00	TcMARK_CONTIG_420	29,693 – 30,562 (-)	266/287 (92%)

## 2.1.2 Análisis bioinformático de la estructura de la TcNMNAT putativa.

Partiendo de la secuencia origen del candidato 2 (tabla 2-1) se obtuvo la correspondiente a la secuencia de aminoácidos. Con esta se efectuó un análisis *in silico* de los distintos niveles de estructura de esta NMNAT putativa de *T. cruzi* (TcNMNAT). La estructura primaria de esta proteína putativa tiene una longitud de 289aa, una masa molecular de 32031.4Da y un punto isoelectrico teórico de 5,85. Todo esto de acuerdo con las predicciones del programa *Protparam* (Gasteiger et al. 2005). De igual manera este nivel de estructura posee motivos que pueden catalogar a este candidato como una posible NMNAT, tal y como se muestra en la tabla 2-4. En esta tabla se observa que de acuerdo con la base de datos *Conserved Domain Database* del NCBI (Marchler-Bauer et al. 2013) se detectaron dos motivos: un indicador de un posible sitio activo basado en la similitud de secuencia con otras isoenzimas NMNAT, y un motivo (T/H)XGH, relacionado con la catálisis de nucleotidil-transferasas. De igual forma la base de datos *Pfam* (Finn et al.

2006) detectó la presencia de un dominio propio de citidil-transferasas, un tipo de nucleotidil-transferasas.

**Tabla 2-4. Dominios y motivos en la estructura primaria de la TcNMNAT.** Motivos encontrados en la *Conserved Domain Database* del NCBI. Clasificación del dominio encontrado mediante la búsqueda en la base de datos *Pfam*.

Herramienta	NCBI Conserved Domain Database		
Motivos	Región secuencia	Residuos característicos	Secuencia
Sitio Activo NMNAT	5-21	9	ACGSFN <del>PITNM</del> HLRMFE
(T/H)XGH	13-16	4	<del>TN</del> MH
Herramienta	Pfam		
Clasificación	Familia	Clan	Región secuencia
Dominio	CTP_transf_2	CL0039	35-198
Descripción	Citidil-transferasa	HIGH-signature proteins	

Para el modelamiento de patrones de estructura secundaria se hizo uso de tres distintos algoritmos de predicción; todos ellos presentados en la tabla 2-5.

- *El algoritmo PDH*: un algoritmo de tercera generación, con una precisión mayor al 70% y basado en redes neuronales adaptativas.
- *El algoritmo GORIV*: que se basa tanto en las propensiones de cada aminoácido a formar una determinada estructura secundaria, como en las vecindades de los mismos en una ventana dinámica de determinada longitud. Consta de una precisión aproximada del 64%.
- El algoritmo PREDATOR (precisión ~68-75%), que se basa en el reconocimiento de aminoácidos potencialmente unidos por puentes de hidrógeno.

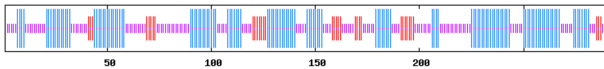
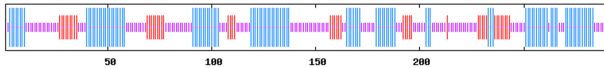
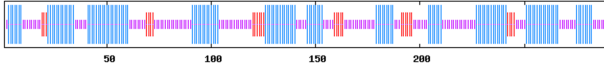
Estos programas se utilizaron por medio del servidor NPS@ (*Network Protein Sequence Analysis*) (Combet et al. 2000). En general los tres métodos bioinformáticos mostraron



resultados similares con un promedio de residuos en hélices alfa del 42,91%  $\pm$ 3,90, en láminas beta del 12.57%  $\pm$ 3,36 y de regiones aleatorias del 44.52%  $\pm$ 1,11 (tabla 2-5).

**Tabla 2-5. Predicción de patrones de estructura secundaria por algoritmos de segunda y tercera generación para la TcNMNAT hipotética (candidato 2).**

Porcentajes de residuos predichos como hélices alfa, láminas beta o regiones aleatorias, respecto al número total de aminoácidos (289) de la secuencia. Las regiones de hélices alfa y láminas beta se muestran en azul y rojo, respectivamente; las regiones aleatorias se observan en púrpura.

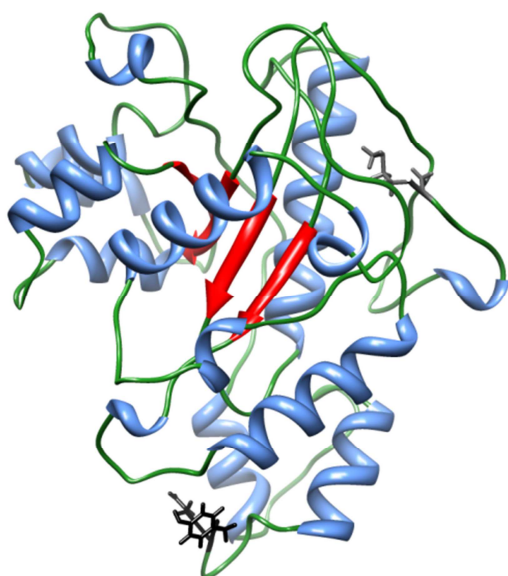
Herramienta bioinformática	Hélice- $\alpha$ (%)	Lámina- $\beta$ (%)	Random Coil (%)	Perfil gráfico
GOR4	44.98	11.76	43.25	
PHD	38.41	16.26	45.33	
PREDATOR	45.33	9.69	44.98	

El modelamiento de la estructura terciaria y la asignación de una función putativa, se efectuaron mediante la simulación de un modelo de tridimensional para la secuencia de aminoácidos del candidato 2 mediante el servidor I-TASSER (Roy, Kucukural, and Zhang 2010; Roy, Yang, and Zhang 2012; Y. Zhang 2008).

El mejor de los cinco modelos alternativos arrojados por el servidor, posee un C-score de -0.78, un RMSD de 7.8 Angstrom y un TM-score de 0.61 (figura 2-1). En dicho modelo es notable la presencia de un plegamiento tipo *Rossmann*; característico de proteínas que se unen a nucleótidos (motivo  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ ). Este modelo tridimensional corrobora las predicciones de estructura secundaria simuladas por los algoritmos GORIV, PDH y PREDATOR. Así mismo, los términos de ontología genética (GO terms) predichos por este servidor para la función de la proteína en cuestión son congruentes con las características funcionales conocidas para proteínas NMNAT: GO: 0005524, unión a ATP

(94% confianza), GO: 0004515, actividad nicotinato-nucleótido-adenilil-transferasa (94% confianza) y GO: 0000309, nicotinamida-nucleótido-adenilil-transferasa (74% confianza). Por otra parte, el servidor I-TASSER mostró predicciones acerca de la función proteica, mediante el método para la anotación de función proteica COFACTOR (Roy, Yang, and Zhang 2012), y el algoritmo de comparación y alineamiento estructural de proteínas TM-align (Y. Zhang and Skolnick 2005).

**Figura 2-1. Modelo de estructura terciaria de la proteína putativa TcNMNAT mediante el servidor I-TASSER.** Hélices alfa en azul, láminas beta en rojo y *random coils* en verde. Para el N-terminal (gris) y el C-terminal (negro) se muestran sus respectivas cadenas laterales (Metionina y Tirosina respectivamente).



Herramienta	I-TASSER
Algoritmo predominante	<i>Threading</i>
C-score	-5 < -0.78 < 2
TM-score	0 < 0.61 ± 0.14 < 1
RMSD hipotético.	7.8 ± 4.4 Å

La herramienta COFACTOR detectó los mejores 5 homólogos estructurales en el *Protein Data Bank* (PDB) (Bernstein et al. 1978) para el candidato evaluado (tabla 2-6). De esta tabla se destaca el hecho de que todos los homólogos poseen un código EC 2.7.7.1/18, lo que indica que son isoenzimas de la familia de las NMNAT (EC: 2.7.7.1) o NaMNAT (EC: 2.7.7.18). El homólogo más similar de código PDB: 1NUU (X. Zhang et al. 2003), corresponde precisamente a un modelo por cristalografía de la isoforma mitocondrial de la NMNAT humana (NMNAT3).

El programa TM-align identificó los 9 mejores análogos estructurales de la TcNMNAT modelada (tabla 2-7). Ocho de estos análogos estructurales corresponden igualmente a

isoenzimas de la NMNAT en distintos organismos, mientras que el noveno corresponde a una ATP sulfurilasa de soya; también conocida como ATP sulfato-adenilil-transferasa. Especialmente, los dos mejores análogos estructurales de códigos PDB: 1KR2 (Zhou et al. 2002b) y 1NUP (X. Zhang et al. 2003) corresponden respectivamente a estructuras por cristalografía de las isoformas nuclear (NMNAT1) y mitocondrial (NMNAT3) de la NMNAT de *Homo sapiens*.

**Tabla 2-6. Mejores homólogos estructurales de la TcNMNAT, según COFACTOR.** Intervalo de confianza, Código PDB de la plantilla, TM-score (medida de la similitud global) entre plantilla y modelo, RMSD entre los residuos alineados, Identidad de la región alineada. Taza de cobertura del alineamiento, Código EC y residuos predichos para el sitio activo.

Confianza	PDB	TM-score	RMSD	Identidad	Cobertura	Código EC	Residuos del sitio activo.
0.461	1NUU	0.700	1.45	0.269	0.734	<u>2.7.7.1</u>	36,38,46,102,164,247,271
0.437	1KR2	0.708	1.62	0.287	0.747	<u>2.7.7.1</u> <u>2.7.7.18</u>	36,38,46,164,168,247,251,271
0.401	3e27	0.601	1.72	0.189	0.640	<u>2.7.7.18</u>	124,162,178,250,252
0.389	1K4M	0.651	2.48	0.184	0.723	<u>2.7.7.18</u>	37,124,162,178
0.369	1YUN	0.631	2.66	0.187	0.716	<u>2.7.7.18</u>	46,81,271

**Tabla 2-7. Mejores análogos estructurales de la TcNMNAT, según TM-align.** Código PDB de la plantilla, TM-score (medida de la similitud global) entre plantilla y modelo, RMSD entre los residuos alineados, Identidad de la región alineada y cobertura.

PDB	TM-score	RMSD	Identidad	Cobertura
1kr2	0.708	1.62	0.287	0.747
1nup	0.700	1.43	0.269	0.734
1k4k	0.653	2.38	0.184	0.720
1yum	0.636	2.68	0.185	0.723
2qtr	0.608	1.74	0.187	0.647
1kaq	0.597	1.73	0.185	0.637
2h2a	0.587	2.17	0.177	0.644

3h05	0.513	1.89	0.182	0.550
4mafA	0.481	3.90	0.107	0.609

Para la validación del modelo se llevaron a cabo minimizaciones de energía gracias al programa *UCSF Chimera v1.8* (Pettersen et al. 2004). Utilizando distintos pasos de minimización con un tamaño de 0,02 angstroms. Los modelos minimizados posteriormente se sometieron al servidor RAMPAGE (*Ramachandran Plot Assessment*) (Lovell and Davis 2003), en aras de determinar la cantidad de residuos en conformaciones poco favorables de acuerdo con sus ángulos psi ( $\Psi$ ) y phi ( $\Phi$ ) tras la minimización de energías; y de esa forma tener un indicio de la calidad del modelo. Los resultados para el número de residuos en posiciones favorables, permitidas y desfavorables se muestran en la tabla 2-8.

**Tabla 2-8. Comparación entre modelos de la estructura terciaria de la TcNMNAT con distintos grados de minimización de energías.** Número de residuos en posiciones favorecidas, permitidas y no permitidas, de acuerdo con las simulaciones del *plot* de Ramachandran por el servidor RAMPAGE, para modelos estructurales de la TcNMNAT con distinto número de pasos de minimización.

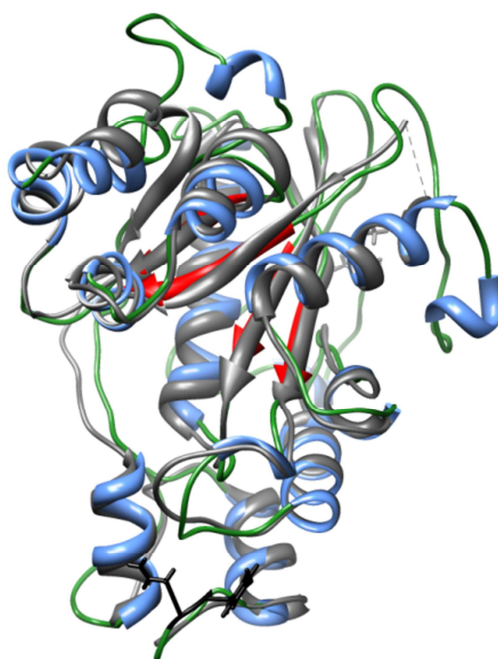
No. Pasos	Posiciones favorecidas	Posiciones permitidas	Posiciones no permitidas
0	245	24	18
200	239	31	17
500	242	26	19
700	242	24	21
1000	239	26	22
1500	235	30	22

Esta tabla evidencia que el número de residuos en posiciones no permitidas disminuye en cierta medida a los 200 pasos de minimización, pero posteriormente aumenta proporcionalmente en función del número de pasos de minimización. Por esta razón se tomaron los 200 pasos de minimización y el correspondiente modelo minimizado, como plantilla para simulaciones posteriores.

A continuación se realizaron alineamientos estructurales entre la TcNMNAT con la estructura terciaria de la NMNAT humana (HsNMNAT) de código PDB: 1NUU (X. Zhang et al. 2003) generada a partir de datos de difracción de rayos X (XRD). Estos se

realizaron mediante la herramienta *Matchmaker* del programa *UCSF Chimera v1.8* (Pettersen et al. 2004) y mediante el servidor DALI (Holm and Rosenström 2010). Los resultados de tales alineamientos se muestran en la figura 2-2. En esta figura se evidencian claras coincidencias estructurales en varias hélices alfa y láminas beta de las proteínas superpuestas; con un RMSD de 1.5 angstroms para 168 pares de átomos, y 1.022 angstroms para 212 pares de átomos evaluados. El análisis de los distintos niveles de estructura de la proteína aporta importantes argumentos a favor de la pertenencia del candidato del presente estudio a la familia de las NMNAT.

**Figura 2-2. Alineamientos estructurales entre la TcNMNAT con la estructura terciaria de la NMNAT humana (1NUU).** Superposición de modelos visualizado por el programa *USCF Chimera*: 1NUU (gris), TcNMNAT (Colores). Valores de RMSD según las herramientas utilizadas para el alineamiento estructural.



Herramienta Bioinformática	No. pares de átomos.	RMSD
<i>Matchmaker</i>	168	1.022
DALI <i>pairwise</i>	212	1.5

La aproximación bioinformática provee de numerosos argumentos que sugieren que : (1) existe un marco de lectura en el genoma de *Trypanosoma cruzi* que se corresponde con la secuencia del candidato a TcNMNAT propuesto desde un principio, y (2) La proteína putativa codificada por dicho marco de lectura consta de atributos estructurales que la identifican como una NMNAT. En consecuencia se cuenta con razones e información suficiente para realizar el subsecuente acercamiento experimental, teniendo como

objetivo de constatar mediante distintas técnicas experimentales la existencia de dicho candidato y su identidad funcional como NMNAT.

## **2.2 Aproximación experimental.**

### **2.2.1 Obtención de Ácidos nucleicos de *Trypanosoma cruzi*.**

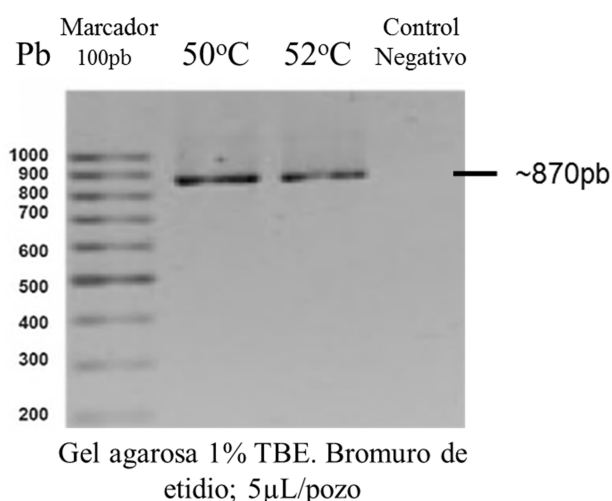
Inicialmente se contaba con epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brener cultivados *in vitro*. El mantenimiento del cultivo fue realizado por personal entrenado para ello. Partiendo lisados de estos parásitos, tratados con proteinasa K, se realizó la extracción de ADN genómico a partir método de fenol cloroformo (Pereira et al. 2000).

### **2.2.2 Clonación de la *Tcnmnat*.**

Con el objeto de diseñar y clonar un plásmido recombinante para la expresión heteróloga de la TcNMNAT en *Escherichia coli*, Inicialmente se estandarizaron las condiciones para la amplificación de la secuencia candidato de 870pb, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dicha estandarización se realizó con los cebadores diseñados en la metodología (Tabla 1-1). Las temperaturas de denaturación y extensión se utilizaron según las recomendaciones del respectivo fabricante, de acuerdo con el sistema de amplificación utilizado (*Pfu ADN polimerasa* de Fermentas o *Platinum® PCR supermix high fidelity* de invitrogen); tal y como se especifica en los materiales y métodos para la amplificación de la Tcnmnat por PCR (sección 1.2.1). Para la determinación de la temperatura de anillamiento se evaluaron temperaturas, al menos 5°C por debajo de la temperatura de anillamiento teórica calculada a partir del contenido GC (58°C). Para esto

se efectuaron reacciones de PCR a temperaturas de anillamiento (Ta) de 50°C y 52°C, usando como plantilla ADN genómico de *Trypanosoma cruzi* (200ng/μL). En la figura 2-3 se observa en ambos tratamientos la amplificación, de una banda ubicada entre los 800 y los 900pb según lo indicado por el marcador de peso molecular.

**Figura 2-3. Amplificación del ORF de la TcNMNAT (870pb) a partir de DNA genómico.** Electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) en TBE. Bromuro de etidio. Marcador de peso molecular, amplificados desde gADN usando Ta de 50°C y 52°C y control negativo (reacción de PCR sin plantilla).



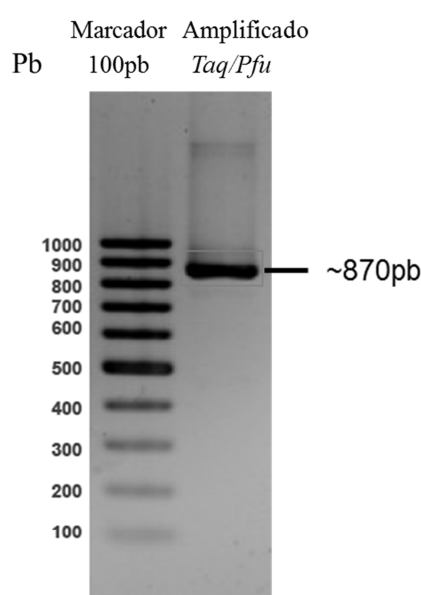
El tamaño estimado de la banda concuerda con el tamaño teórico de la secuencia candidato a amplificar. Ambos tratamientos no muestran amplificación alguna de inespecificidades. No obstante la banda de ~870pb del tratamiento de 50°C muestra ligeramente una mayor intensidad. Por lo tanto se estableció 50°C como temperatura de anillamiento a utilizar en experimentos posteriores.

Ya habiendo estandarizado la temperatura de anillamiento óptima para la amplificación del fragmento, se buscó obtener un inserto apto para ser ligado en el vector pET100 D-TOPO (Invitrogen). El sistema de amplificación estándar (usando la *Taq* polimerasa) genera fragmentos amplificados con asideras en los extremos 3' no adecuadas para la ligación al vector mencionado. Por ende se optó por amplificar partiendo de ADN genómico el fragmento en cuestión mediante *Long PCR*, y con el amplificado de dicha



reacción, realizar una segunda PCR con una polimerasa de correctura (*Pfu* polimerasa) la cual no deja extremos adicionales; tal y como se indica en la metodología. En la figura 2-4 se observa el amplificado del fragmento de ADN tras utilizar los dos procedimientos mencionados.

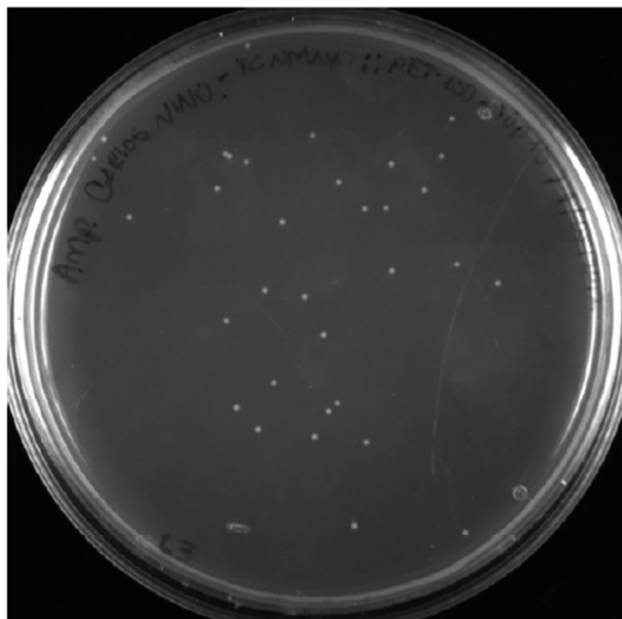
**Figura 2-4. Amplificación del fragmento codificante para la *TcNMNAT* por long PCR y PCR con *Pfu* polimerasa.** Electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) TBE. Bromuro de etidio. Marcador de peso molecular y amplificado final tomando como plantilla el amplificado de gADN por Long PCR (Ta 50°C).



Gel agarosa 1% TBE. Bromuro de etidio; 5µL/pozo.

En esta figura se puede apreciar claramente una banda de ~870pb, la cual fue cuantificada por densitometría, donde se obtuvo una cantidad de 46ng para la banda en cuestión. El fragmento amplificado se ligó al vector pET100 D-TOPO; utilizando 12,1ng de inserto en una relación molar 4:1 con respecto a la cantidad de plásmido empleado. Con la reacción de ligación resultante se transformaron células competentes de *Escherichia coli*, de la cepa de mantenimiento TOP10. En la figura 2-5 se observan las colonias resultantes del mencionado proceso de transformación. Teniendo en cuenta este resultado se calculó una eficiencia de transformación de 2,975 UFC/ng de ADN.

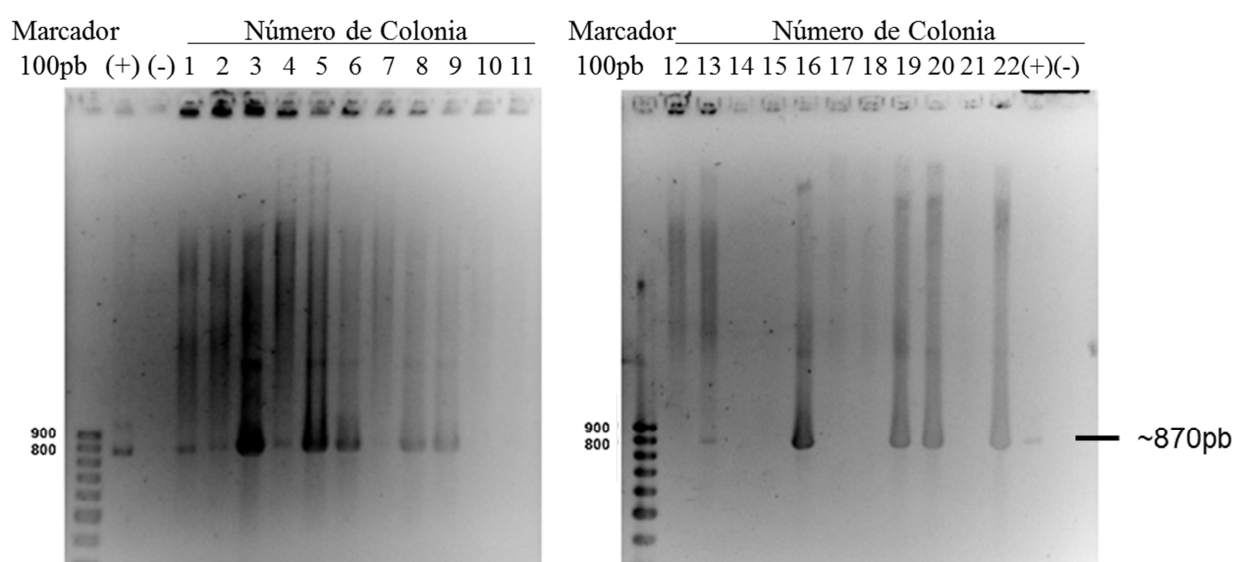
**Figura 2-5. Transformación de células competentes TOP10 con el producto de ligación pET100/Tcnmnat.** Selección en medio Lb-ampicilina. Colonias seleccionadas de la cepa TOP10 transformadas por choque térmico a 42°C.



Medio de selección: Lb + Ampicilina

Posteriormente las colonias transformadas se sometieron a un proceso de verificación por medio de PCR de colonia, a fin de saber que colonias poseían el vector recombinante con el inserto de interés. En la figura 2-6 se observa la amplificación de una muestra de 22 colonias, en donde el 59% de las mismas amplifican claramente un fragmento de ~870pb que se corresponde con los respectivos controles positivos. Esto indica que tales clones poseen el vector recombinante con el fragmento de interés.

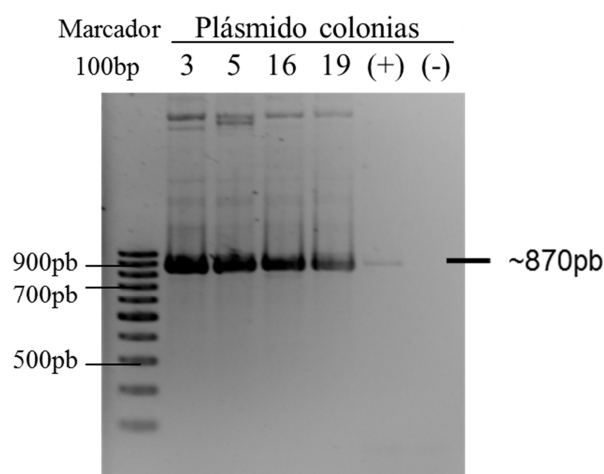
**Figura 2-6. Rastreo de transformantes por PCR de colonia.** Electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) TBE. Bromuro de etidio. Marcador de peso molecular y reacciones de PCR de colonias transformadas con el producto de ligación pET100/Tcnm<sup>nat</sup> (Ta 50°C). Amplificado de ~870pb para colonias positivas.



Gel agarosa 1% TBE. Bromuro de etidio; 5µL/pozo

De los clones positivos para el ensayo anterior, se escogieron los clones 3, 5, 16 y 19 (dada la abundancia relativa de su amplificado) para ser sujeto de un proceso de extracción de plásmido por medio de lisis alcalina, tal como se especifica en la metodología (sección 1.2.1). A los respectivos plásmidos extraídos (nombrados con el número del clon del cual provenían) se les verificó la presencia del inserto de interés mediante dos técnicas. Por un lado se realizaron ensayos de PCR en aras de amplificar el inserto de ~870pb. Por otra parte se realizaron ensayos de digestión con la enzima de restricción EcoRV; donde los perfiles electroforéticos de la digestión se compararon con simulaciones *in silico* para las secuencias del vector recombinante y su contraparte vacía, generadas por el servidor *NEBcutter V2.0* (Vincze, Posfai, and Roberts 2003). En la figura 2-7 se observa el resultado de la amplificación por PCR del inserto, usando los plásmidos extraídos como plantilla.

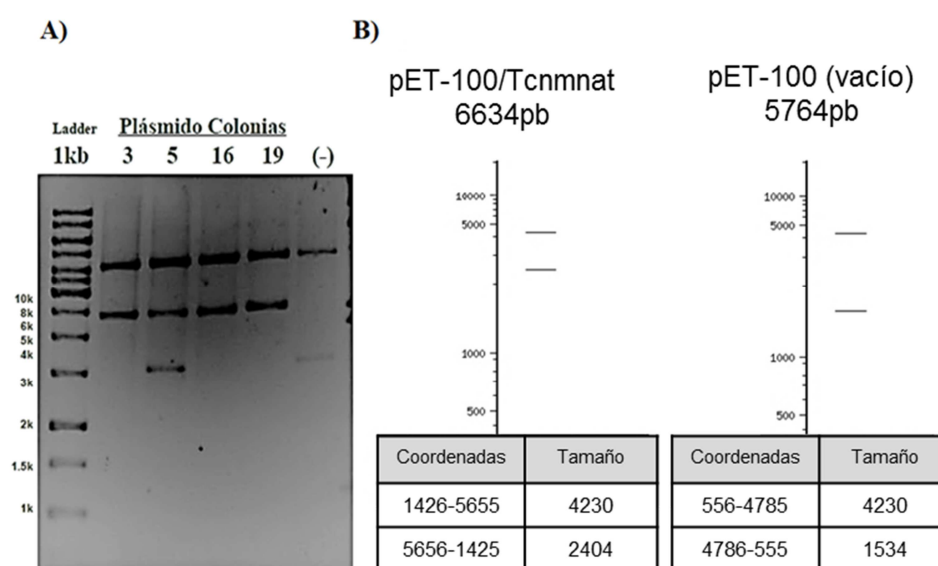
**Figura 2-7. Verificación de inserción del fragmento *Tcnmnat* en el vector *PET100/D-TOPO* por ensayos de PCR.** Electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) TBE. Bromuro de etidio. Marcador de peso molecular, amplificados por PCR de los plásmidos extraídos de las colonias 3, 5, 16 y 19 (transformantes *E. coli* TOP10 pET100/*Tcnmnat*), control positivo (gADN) y control negativo (reacción sin plantilla).



Gel de agarosa 1%, TBE. Bromuro de etidio.

En este gel se puede ver la banda característica de ~870pb, que indica la presencia de vectores recombinantes con la secuencia de interés en todos los clones seleccionados. En la figura 2-8 se observan patrones electroforéticos de digestión del plásmido recombinante con la enzima *EcoRV*. Tales patrones son congruentes con las simulaciones para las secuencias del vector con el inserto, lo cual confirma el resultado anterior. No obstante en el caso del plásmido de la colonia 5 se observa que, adicional a las bandas del perfil que muestran la presencia de plásmido en el inserto, existe una tercera banda de ~1534pb. Esta banda es congruente con la simulación para el vector vacío. Ello sugiere que en dicho clon se encuentran plásmidos de ambos tipos: tanto recombinantes con el inserto de 870pb, como recombinantes con un inserto de mucho menor tamaño. Esto indica un evento de co-transformación.

**Figura 2-8. Verificación de inserción del fragmento *Tcnmnat* en el vector *PET100/D-TOPO* por ensayos de digestión con la enzima de restricción *EcoRV*.** A) Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) en TBE (Bromuro de etidio): Marcador de peso molecular, plásmidos extraídos de cepas de mantenimiento TOP10 y Control negativo (vector sin inserción de fragmento). B) Perfil teórico de electroforesis según el programa NEB CUTTER: perfil de bandas para el vector con el inserto y perfil de bandas para el vector vacío.



Gel de agarosa 0,8% TBE. Bromuro de etidio.

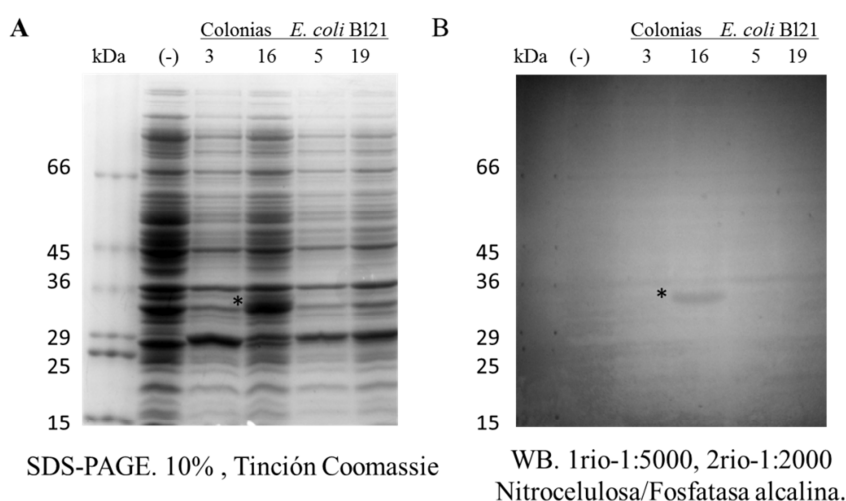
### 2.2.3 Expresión de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT.

A los clones seleccionados y verificados de la cepa *TOP10* (clones 3, 5, 16, y 19) se les realizó la extracción de los plásmidos recombinantes pET100/Tcnnmat; estos se emplearon en la transformación de células *E. coli* BL21 (DE3) (cepa de expresión). A los transformantes que resultaron se les indujo la expresión de la proteína recombinante a 37°C, con 1mM de inductor (IPTG).

Todos los transformantes se indujeron cuando el cultivo se encontraba a una OD<sub>600</sub> de 0.6, buscando un estimativo de la cantidad de proteína recombinante producida. Esto se efectuó como se menciona en los materiales y métodos para la expresión de la 6xHisTcNMNAT (sección 1.2.2).

Los extractos celulares colectados tras inducir toda la noche, se evaluaron mediante SDS-PAGE y la proteína recombinante se monitoreó mediante *Western blot* contra la marca de seis histidinas (6xHis), adicionada al extremo amino terminal durante la clonación a la TcNMNAT por el vector pET-100/D-TOPO. Tal y como se observa en la figura 2-9 de los 4 clones evaluados solo en el clon transformado con el plásmido de la colonia 16 mostró una banda de ~35kDa consistente con el peso esperado para la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT.

**Figura 2-9. Inducción de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en células transformadas BL21 (DE3).** A) SDS-PAGE 10% (p/v) tinción azul de Coomassie. B) Ensayo de Western blot por fosfatasa alcalina (primario: IgG $\alpha$ His 1:5000; secundario  $\alpha$ His-ratón 1:2000). Marcador de peso molecular, Control negativo (cepa sin transformar) y clones de *E. coli* transformados con el vector de expresión de la 6xHisTcNMNAT (Colonias 3, 5, 16, 19). Asterisco señala la proteína recombinante (~35kDa).

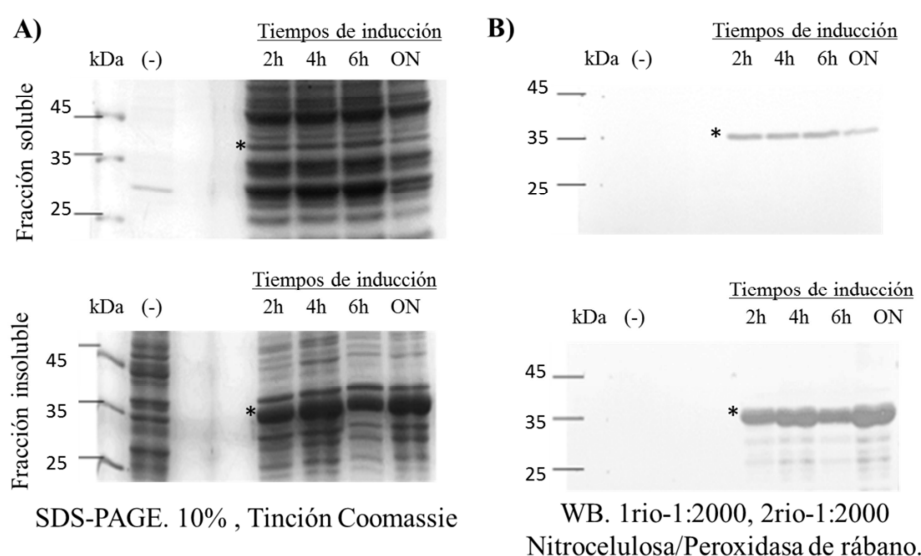


Con el objeto de establecer las condiciones de expresión de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT, se buscó establecer que tanto de la proteína recombinante se expresa de manera soluble y que tanto como proteína insoluble (cuerpos de inclusión). Para ello, se evaluó la cantidad relativa de proteína expresada a distintos tiempos de inducción, tanto en la fracción soluble como en la insoluble. Las fracciones solubles e insolubles de cada tiempo de inducción se analizaron por SDS-PAGE y se confirmó la presencia de la proteína en los distintos tratamientos por *Western blot*, empleando anticuerpo anti-6xHis contra la marca de histidinas.

Tal y como se observa en el SDS-PAGE de la figura 2-10, a partir de las dos horas de inducción aparece una banda de ~35kDa detectable por *Western blot*, tanto para las fracciones de proteína insoluble, como para las de proteína soluble. Dicha banda muestra ser abundante en aquellos tratamientos que corresponden a la fracción proteica insoluble, no obstante también es notoria en las fracciones solubles correspondientes. Este resultado sugiere que la expresión de proteína como cuerpos de inclusión es mayor que aquella expresada como proteína soluble para todos los tiempos de inducción. De igual forma no se observa que en los tiempos de inducción para las fracciones solubles,

exista un incremento significativo de proteína recombinante en función del tiempo. Por lo tanto, se consideró que a las dos horas de inducción se establece un tiempo óptimo para la expresión de la 6xHisTcNMNAT soluble, en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3).

**Figura 2-10. Expresión de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en la fracción soluble e insoluble de células BL21 (DE3).** A) SDS-PAGE al 10% (p/v) tinción azul de Coomassie. B) Ensayo de Western blot por peroxidasa de rábano (primario: IgG $\alpha$ His 1:2000; secundario  $\alpha$ His-ratón 1:2000). Marcador de peso molecular, Control negativo (células sin transformar) y distintos tiempos de inducción para la fracción soluble (sección superior) e insoluble (sección inferior) de células transformadas e inducidas. Asterisco señala la proteína recombinante (~35kDa). Para cada tiempo de inducción y el control negativo se tomó la misma cantidad de cantidad de células de acuerdo con la absorbancia.



Sabiendo entonces que la proteína 6xHisTcNMNAT se expresaba mayormente como cuerpos de inclusión, se buscó estandarizar condiciones que favorecieran la expresión de esta proteína en la fracción soluble. Este proceso de optimización consistió en: estandarizar temperaturas de inducción, concentraciones de inductor y la fase de crecimiento en donde se inicia la inducción; Así como comparar la expresión de proteína soluble en cepas alternativas y bajo co-expresión con un plásmido recombinante para expresión de chaperonas.

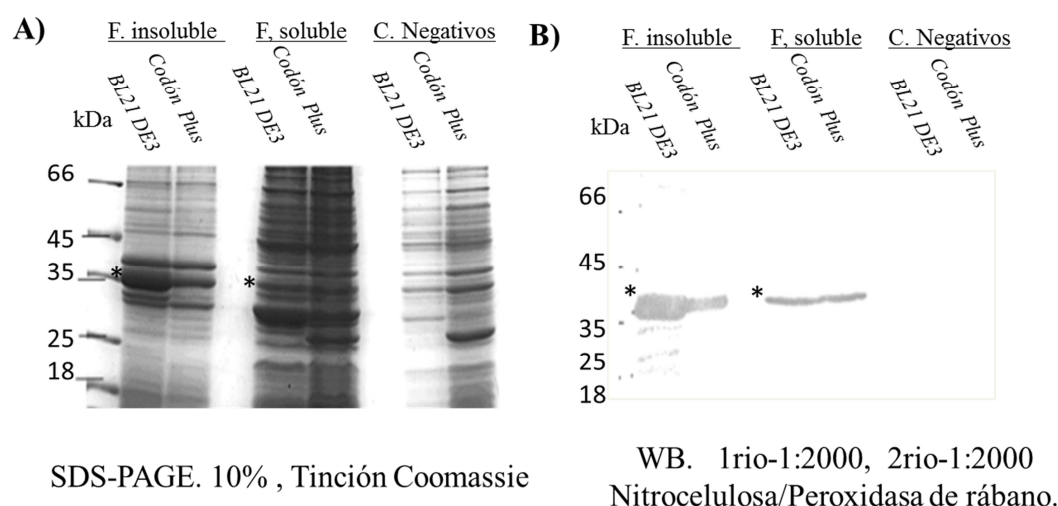


---

En cuanto a la estandarización de las condiciones de inducción, se evaluó el efecto de la temperatura y la concentración de inductor sobre la expresión de proteína recombinante. Para esto se indujo a temperatura ambiente (alrededor de 18°C), con menores concentraciones de inductor (0,5mM de IPTG), y aumentando un poco el OD<sub>600</sub> en la fase de crecimiento (0,7). No se encontraron diferencias apreciables respecto a la producción de 6xHisTcNMNAT en la fracción soluble. Por ello las inducciones de los experimentos relacionados con la purificación de la proteína 6xHisTcNMNAT se realizaron bajo las condiciones mencionadas, dado que se no se encuentra un incremento de la cantidad de proteína soluble a altas concentraciones de inductor (1mM), temperaturas de 37°C, ni a fases de crecimiento más tempranas (OD<sub>600</sub> 0,6). Además no se afecta la calidad del resultado.

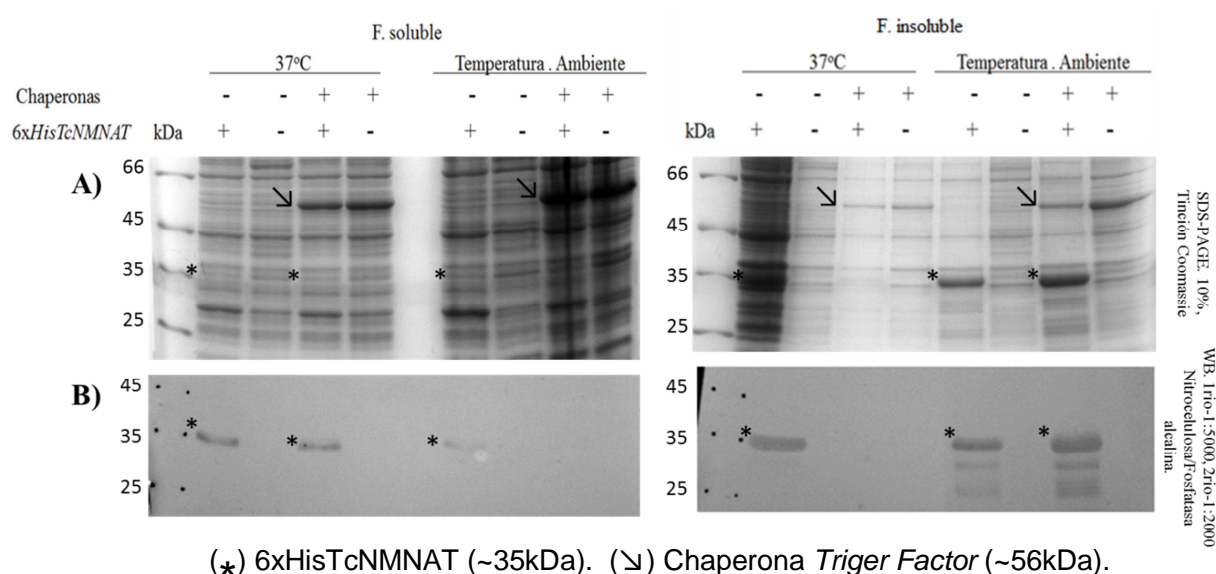
Para evaluar la expresión de la 6xHisTcNMNAT en cepas alternativas, se comparó la expresión de proteína inducida en las fracciones soluble e insoluble de cepas BL21 (DE3) y BL21-CodonPlus (DE3)-RIL. En la figura 2-11 se observan los perfiles de expresión para ambas cepas por SDS-PAGE y la correspondiente detección de la proteína recombinante por *Western blot* contra la marca de histidinas. En esta figura se observa que la proteína recombinante es expresada tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble de ambas cepas. De igual forma también se puede concluir que no hay mayor diferencia en la producción de proteína soluble entre las dos cepas evaluadas, habiendo empleado las mismas condiciones de inducción. Sin embargo la cantidad de proteína recombinante como cuerpos de inclusión es mayor en la cepa BL21 (DE3) que en la cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL.

**Figura 2-11. Expresión de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en fracciones solubles e insolubles de *E. coli* BL21 (DE3) y BL21-CodonPlus (DE3)-RIL.** A) SDS-PAGE al 10% (p/v) tinción azul de Coomassie. B) Ensayo de Western blot por peroxidasa de rábano (primario: IgG $\alpha$ His 1:2000; secundario  $\alpha$ His-ratón 1:2000). Marcador de peso molecular, fracciones insolubles, fracciones solubles y controles negativos (cepas sin transformar) de la cepa BL21 (DE3) y la cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL; respectivamente. Asterisco señala la proteína recombinante (~35kDa).



Respecto a la evaluación de la expresión de la proteína 6xHisTcNMNAT bajo condiciones de co-transformación, se transformó el vector pET100/Tcnnat, en células *E. coli* BL21 (DE3) previamente transformadas con el plásmido pTf16 (*Takara*); que codifica para la chaperona *Trigger factor* (56kDa). Posteriormente se evaluó la producción de proteína recombinante bajo condiciones de expresión que abarcan temperaturas de inducción de 37°C y temperatura ambiente (alrededor de 18°C), además de la inducción de la 6xHisTcNMNAT sin y con la co-expresión de la chaperona *Trigger factor*. Para los tratamientos que expresan la 6xHisTcNMNAT, las inducciones se realizaron agregando 1mM de inductor (IPTG), cuando el inóculo alcanzó una OD<sub>600</sub> de 0,6 en medio Lb-glucosa (1%) con los antibióticos de selección (ampicilina 100µg/mL y cloranfenicol 50µg/mL). Para los tratamientos que expresan la chaperona *Trigger factor*, el inóculo se incubó en el mismo medio, pero suplementado previamente con el inductor de la chaperona (L-arabinosa 1mg/mL); como se menciona en el apartado sobre co-expresión de chaperonas en la metodología (sección 1.2.2.). El resultado de este experimento se observa en la figura 2-12.

**Figura 2-12. Expresión de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en fracciones solubles e insolubles para *E. coli* BL21 (DE3) co-transformada con pTf16.** A) SDS-PAGE al 10% (p/v) tinción azul de Coomassie. B) Ensayo de Western blot por fosfatasa alcalina (primario: IgGαHis 1:5000; secundario αHis-ratón 1:2000). Marcador de peso molecular y fracciones solubles e insolubles bajo distintas condiciones de inducción: expresión de la 6xHisTcNMNAT (IPTG 1mM), expresión de la chaperona *Triger factor* (L-arabinosa 1mg/mL). Medio de cultivo: Lb-glucosa (1%) ampicilina (100µg/mL) y cloranfenicol (50µg/mL). Inducción toda la noche. La proteína inducida se representa con el signo más (+) y la no-inducida con el signo menos (-). Asterisco señala la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT (~35kDa). Flechas señalan la región donde debe aparecer la chaperona *Triger factor* (~56kDa).



En esta figura se muestra que en los tratamientos que corresponden a la fracción soluble, a 37°C no existen diferencias notorias en los tratamientos respecto a la producción de proteína recombinante soluble. Sin embargo a temperatura ambiente parece haber expresión de esta solo cuando no se co-expresa con el *Triger factor*. Para los tratamientos de la fracción insoluble, a 37°C no se observa la 6xHisTcNMNAT cuando se induce su expresión con el *Triger factor*, mientras que a temperatura ambiente hay una mayor presencia de 6xHisTcNMNAT bajo co-expresión con la chaperona.

Es extraño que cuando se induce el *Triger Factor*, a 37°C se detecta mejor banda de la proteína 6xHisTcNMNAT soluble, mientras que a esta misma temperatura no se detecta nada en la fracción insoluble. En las fracciones solubles, la presencia de una banda de

sobre-expresión en la región de los ~56kDa indica la expresión de la chaperona; por lo que una falla en la expresión del *Triger factor*, no se puede ser la razón por la cual no se observa la 6xHisTcNMNAT en la fracción insoluble de la inducción a 37°C bajo co-expresión. Es posible que en este caso exista error experimental en cuanto a la cantidad de proteína cargada.

De igual manera es notoria la degradación de la proteína a temperatura ambiente, en cuento a los tratamientos de la fracción insoluble. Esto se constata al presenciar bandas de bajo peso molecular que igualmente son detectadas por el anticuerpo contra la marca de histidinas (IgGαHis).

También es importante notar que en los ensayos de expresión correspondientes a la fracción insoluble de proteína, el SDS-PAGE muestra diferencias notorias en la cantidad de proteína total cargada en el gel (debido a la viscosidad de la muestra), lo cual puede estar afectando los resultados en esta parte del experimento. No obstante el objetivo principal de este experimento es la proteína nativa. Por ende se concluye que la co-expresión con chaperonas no tuvo un efecto significativo sobre la solubilidad de la 6xHisTcNMNAT; pues no se incrementa la presencia de esta proteína en la fracción soluble.

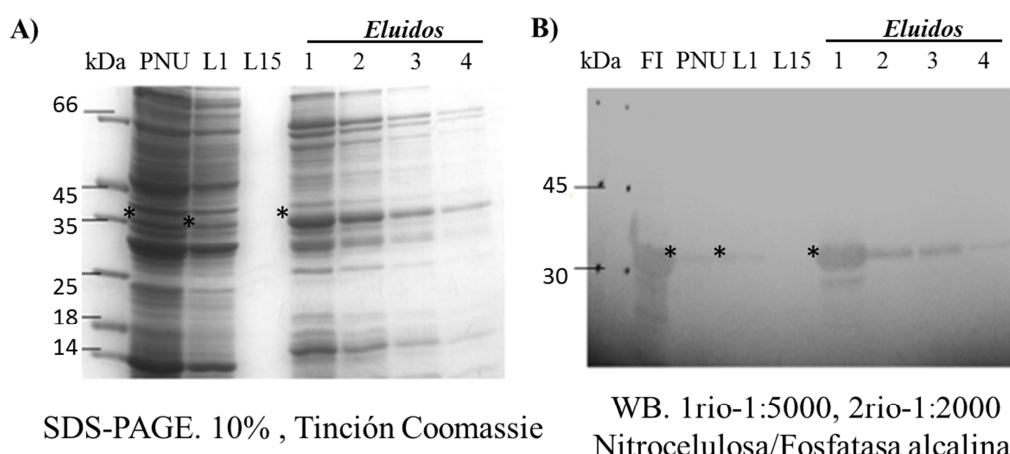
## 2.2.4 Purificación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT.

A fin de obtener una fracción lo suficientemente pura como para realizar ensayos de actividad y caracterizar enzimáticamente la 6xHisTcNMNAT, inicialmente se llevó a cabo una purificación parcial de esta proteína por medio de cromatografía de afinidad a Níquel (Ni-NTA) (Quiagen). Para esta cromatografía de afinidad, se partió de una la fracción soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) pET-100/Tc<sub>nmnat</sub> inducidas. Esta cromatografía se llevó a cabo antes de optimizar las condiciones de expresión de la 6xHisTcNMNAT; como se mencionó en la sección 2.2.3. Por lo tanto la respectiva inducción se realizó bajo las siguientes condiciones previamente establecidas: 37°C, 1mM de IPTG y OD<sub>600</sub> de 0,6. La fracción proteica soluble se obtuvo mediante el método de lisis por choque térmico con nitrógeno líquido que se describe en la metodología (sección 1.2.2).

Esta fracción se unió a la resina previamente equilibrada, usando 10mM de imidazol en el respectivo *buffer* de unión (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM pH 8,0). Tras incubar por una noche sobre hielo, se realizaron varios lavados, cada uno con 1mL del mismo *buffer* pero usando 20mM de imidazol, hasta alcanzar una densidad óptica constante a 280nm (menor a 0,05). Finalmente se obtuvieron 4 eluidos con el *buffer* mencionado con 250mM de imidazol. Para ello se incubó la resina lavada con dicho *buffer* de elución durante toda la noche para el primer eluido y durante una hora para cada uno de los tres eluidos restantes. Todo esto se efectuó tal y como se menciona en el apartado de la metodología para la cromatografía de afinidad a Ni-NTA (sección 1.2.3).

Eventualmente se monitoreó esta cromatografía, observando las proteínas no unidas a la resina, lavados y eluciones colectadas mediante SDS-PAGE y Western blot. En la figura 2-13, se observa el resultado de dicho seguimiento; en donde es posible apreciar la purificación parcial y el enriquecimiento de una banda de ~35kDa detectable por *Western blot* mediante el anticuerpo IgGαHis contra la marca de histidinas de la 6xHisTcNMNAT. Por lo que dicha banda corresponde a la proteína recombinante en cuestión.

**Figura 2-13. Purificación parcial de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT por cromatografía de afinidad Ni-NTA. Evaluación preliminar.** A) SDS-PAGE al 10% (p/v) tinción azul de Coomassie. B) Ensayo de Western blot por fosfatasa alcalina (primario: IgGαHis 1:5000; secundario αHis-ratón 1:2000). Marcador de peso molecular, Fracción insoluble (FI, control de Western blot), proteínas no unidas a la resina (PNU), primer lavado a 20mM de imidazol (L1), último lavado a 20mM de imidazol (L15), y eluidos a 250mM de imidazol. Asterisco señala la proteína recombinante (~35kDa).



En esta figura igualmente se detecta la presencia de algunas proteínas contaminantes visibles por SDS-PAGE pero no detectables por *Western blot*. La presencia de tales contaminantes sugiere que es necesario modificar las condiciones de astringencia en la unión y los lavados de la cromatografía, a fin de reducir el número de impurezas.

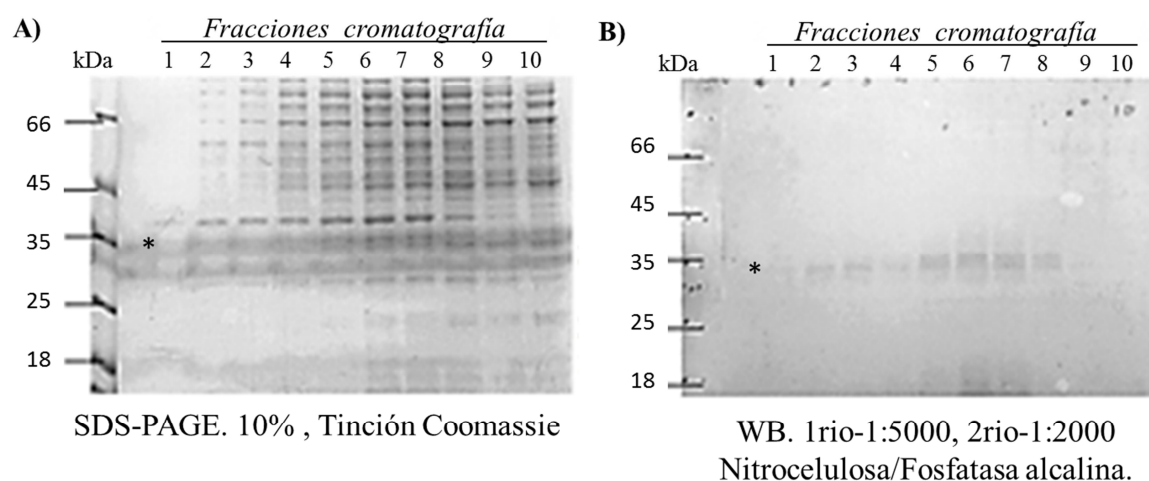
En aras de optimizar el proceso de purificación por cromatografía de afinidad a Ni-NTA, se evaluaron de manera paralela dos posibles alternativas:

- Explorar otros métodos de purificación y pre-tratamientos de la fracción soluble, para sí acoplarlos a una futura cromatografía de afinidad a Ni-NTA en un esquema de purificación.
- Optimizar la purificación de la cromatografía de afinidad a Ni-NTA mediante la estandarización de condiciones que favorezcan el enriquecimiento y la pureza de la 6xHisTcNMNAT en los mismos.

La exploración de métodos de purificación y pre-tratamientos a acoplar a la cromatografía de afinidad, abarcó dos técnicas: la purificación de la proteína por medio de cromatografía de exclusión y el pre-tratamiento de la fracción soluble mediante precipitación utilizando sulfato de amonio.

Para la purificación de la 6xHisTcNMNAT por cromatografía de exclusión, se usó resina *sephadex* G-75, partiendo de la fracción proteica soluble; buscando obtener una fracción enriquecida y libre de algunos contaminantes de bajo peso molecular. De la totalidad de las fracciones colectadas, se determinó que la proteína recombinante se encontraba dentro de las 10 primeras fracciones (250µL cada una). En la figura 2-14 se observa el análisis de estas 10 fracciones de por SDS-PAGE y *Western blot*,

**Figura 2-14. Purificación parcial de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT por filtración en gel.** A) SDS-PAGE al 10% (p/v) tinción azul de Coomassie. B) Ensayo de Western blot por fosfatasa alcalina (primario: IgGαHis 1:5000; secundario αHis-ratón 1:2000). Marcador de peso molecular y las 10 primeras fracciones colectadas (250µL cada una) de la cromatografía de exclusión. Resina utilizada *sephadex* G-75. Asterisco señala la proteína recombinante (~35kDa).



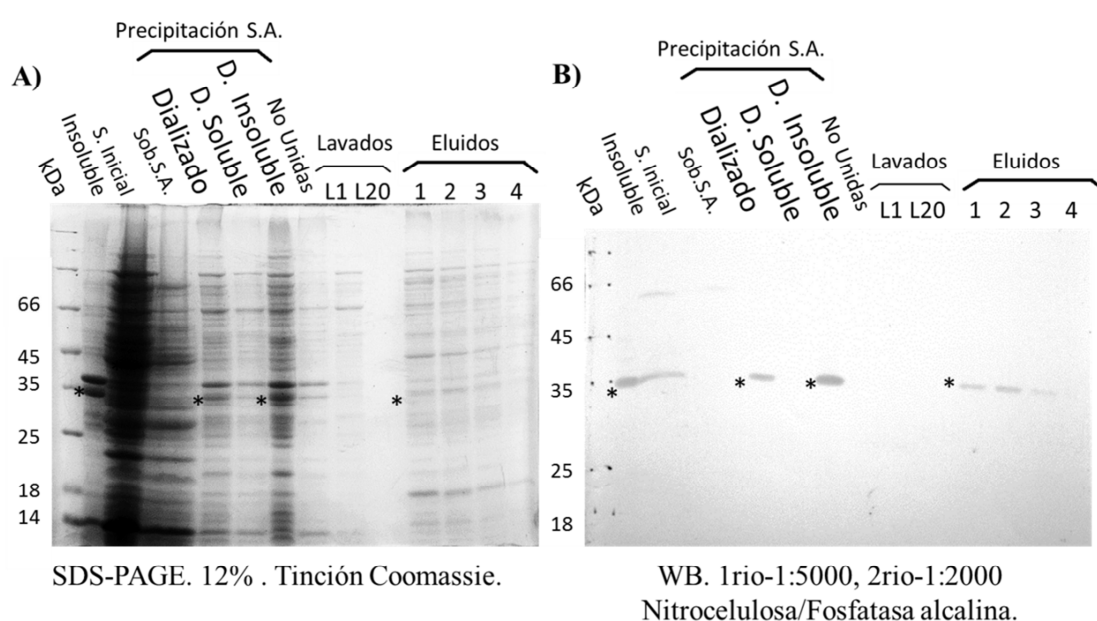
Como se muestra en el *Western blot* la figura 2-14, en las primeras 9 fracciones de las 10 evaluadas, se detecta la banda característica de ~35kDa correspondiente a la proteína 6xHisTcNMNAT. La respectiva señal de inmunodetección presenta un máximo de intensidad en las fracciones 5 y 6, de acuerdo este ensayo. En el respectivo SDS-PAGE se observa que en dichas fracciones predominan bandas con pesos superiores a 30kDa. Ello indica que se enriquecieron algunas fracciones con la proteína.

El hecho de que la proteína recombinante haya sido eluida en las primeras fracciones de la cromatografía indica que esta no se encuentra dentro del rango de resolución de la resina (3000-80000Da). Esto podría explicarse por la constitución de oligómeros. Es posible optimizar este procedimiento utilizando una resina de poro más grande para un rango de fraccionamiento más específico o aumentar el tamaño de la columna a fin de obtener mayor poder de separación.

Para la purificación de la proteína recombinante a partir de la fracción soluble de células inducidas *E. coli* BL21 (DE3) pET-100/Tc<sub>nmnat</sub> empleando sulfato de amonio, se determinó el porcentaje p/v a utilizar para la precipitación de la proteína. Se estableció que con 20% se precipitaba la 6xHisTcNMNAT y se reducían los contaminantes. Posteriormente se acopló este procedimiento a una cromatografía de afinidad: tomando el precipitado a 20% de sulfato de amonio para re-suspenderlo en *buffer* de lisis, dializarlo y seguidamente realizar la unión a la resina Ni-NTA; continuando luego con la respectiva cromatografía. En la figura 2-15 se observa el seguimiento de este proceso mediante SDS-PAGE y *Western blot*. La precipitación por sulfato de amonio y la cromatografía de afinidad se realizaron tal y como se describe en los correspondientes apartados de la metodología (sección 1.2.3)



**Figura 2-15. Precipitación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT con sulfato de amonio al 20%, acoplada a cromatografía de afinidad Ni-NTA.** A) SDS-PAGE 10% (p/v) tinción azul de Coomassie. B) Western blot por fosfatasa alcalina (primario: IgG $\alpha$ His 1:5000; secundario  $\alpha$ His-ratón 1:2000). Marcador de tamaño. *Fracciones iniciales de células inducidas:* fracción insoluble y fracción soluble (*S. inicial*). *Precipitación por sulfato de amonio:* sobrenadante (*Sob.S.A.*), precipitado total (*Dializado*), fracción soluble y fracción insoluble del dializado. *Cromatografía de afinidad acoplada:* proteínas no unidas a la resina, primer lavado a 20mM de imidazol (*L1*), último lavado a 20mM de imidazol (*L20*) y eluidos a 250mM de imidazol. Asterisco señala la proteína recombinante (~35kDa).



En el SDS-PAGE, el tratamiento denominado como “*Dializado*” (que consta del precipitado por sulfato de amonio al 20% de la fracción soluble de células inducidas) muestra un enriquecimiento de la banda que corresponde a la TcNMNAT recombinante según el reconocimiento por *Western blot* (~35kDa). Además este tratamiento presenta una disminución marcada de las bandas contaminantes, especialmente aquellas de ~66kDa, ~27kDa, ~25kDa, ~14kDa. Estas proteínas contaminantes en particular se caracterizan por permanecer como remanentes tras la purificación por cromatografía de afinidad, como puede verse en la figura del experimento anterior (figura 2-13). Sin embargo en los carriles correspondientes a los eluidos de la figura 2-15, se observa muy

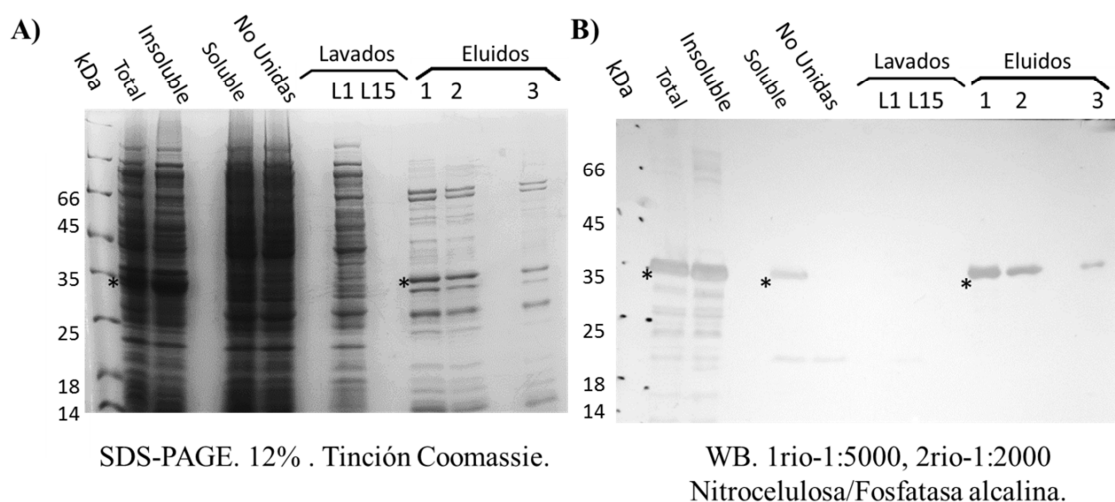
poca proteína total en el SDS-PAGE y una muy baja detección de la proteína recombinante por *Western blot*. Este mismo resultado prevaleció a pesar de utilizar condiciones de mínima astringencia en la unión y los lavados de la cromatografía de afinidad (*buffer* de unión sin imidazol y *buffer* de lavado de 10mM de Imidazol). Por lo que es posible que haya poca retención de proteína total por parte de la resina.

Los tratamientos correspondientes a la fracción soluble y a la fracción insoluble la precipitación por sulfato de amonio en la figura 2-15 (denominados como “*D. soluble*” y “*D. insoluble*”), surgieron tras centrifugar con un pulso de 4000rpm dicho pellet después de ser re-suspendido y sometido a diálisis (tratamiento “*Dializado*”). Esta centrifugación se realizó bajo la sospecha de que no hubiese una buena disolución del dializado original al re-suspenderlo en el *buffer* de lisis; ya que poseía una consistencia lechosa. Al centrifugar con este pulso se obtuvieron dos fases discretas, las cuales se analizaron por SDS-PAGE y *Western blot*. En la fase insoluble del dializado (*D. insoluble*) se observa la mayoría de la proteína total que originalmente estaba en la precipitación por sulfato de amonio, junto con prácticamente toda la 6xHisTcNMNAT, según el ensayo de inmunodetección. Por otra parte en el tratamiento “*D. soluble*” la banda característica de ~35kDa no se puede detectar con el anticuerpo anti-histidinas. Esto indica que el precipitado obtenido por *Salting-out* con 20% de sulfato de amonio presenta problemas para resuspenderse en el *buffer* de lisis. De tal forma se explica la poca cantidad de proteína y el bajo reconocimiento de la banda de ~35kDa en los eluidos de la cromatografía acoplada; ya que si la 6xHisTcNMNAT no se encuentra soluble no puede unirse a la resina Ni-NTA bajo condiciones nativas. Pese a realizar varios ensayos para solubilizar el precipitado, los resultados fueron negativos. Por lo tanto se eliminó esta fase del procedimiento de purificación.

La optimización de la purificación de la 6xHisTcNMNAT por cromatografía de afinidad a Ni-NTA se llevó a cabo estandarizando: el factor de concentración (La razón existente entre el volumen de cultivo inicial y el volumen de *buffer* de lisis con el cual se extrae la fracción soluble), y las condiciones de astringencia representadas por la concentración de imidazol en los *buffers* de unión, lavado y elución.

En las primeras cromatografías de afinidad realizadas como en figura 2-13 se utilizó un factor de concentración (volumen inicial de cultivo/ volumen de *buffer* de lisis) de alrededor de 50 veces. Por cual se propuso inicialmente aumentar dicho factor de concentración a 70 veces, esperando así contar con una fracción soluble más concentrada, y en consecuencia, con una mayor concentración de la 6xHisTcNMNAT; lo que en teoría podría facilitar la captura de esta proteína recombinante por parte de la resina. La cromatografía de afinidad a Ni-NTA realizada bajo un factor de concentración de 70 veces se observa en la figura 2-16; donde se muestran los respectivos SDS-PAGE y *Western blot*.

**Figura 2-16. Purificación parcial de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT por cromatografía de afinidad Ni-NTA.** A) SDS-PAGE al 12% (p/v) tinción azul de Coomassie. B) Western blot por fosfatasa alcalina (primario: IgGαHis 1:5000; secundario αHis-ratón 1:2000). Marcador de peso molecular, Células totales, fracción insoluble, fracción soluble, proteínas no unidas a la resina, primer lavado a 20mM de imidazol (L1), último lavado a 20mM de imidazol (L15) y eluidos a 250mM de imidazol. Factor de concentración: 70 veces (volumen cultivo: volumen *buffer* de lisis). Asterisco señala la proteína recombinante (~35kDa).

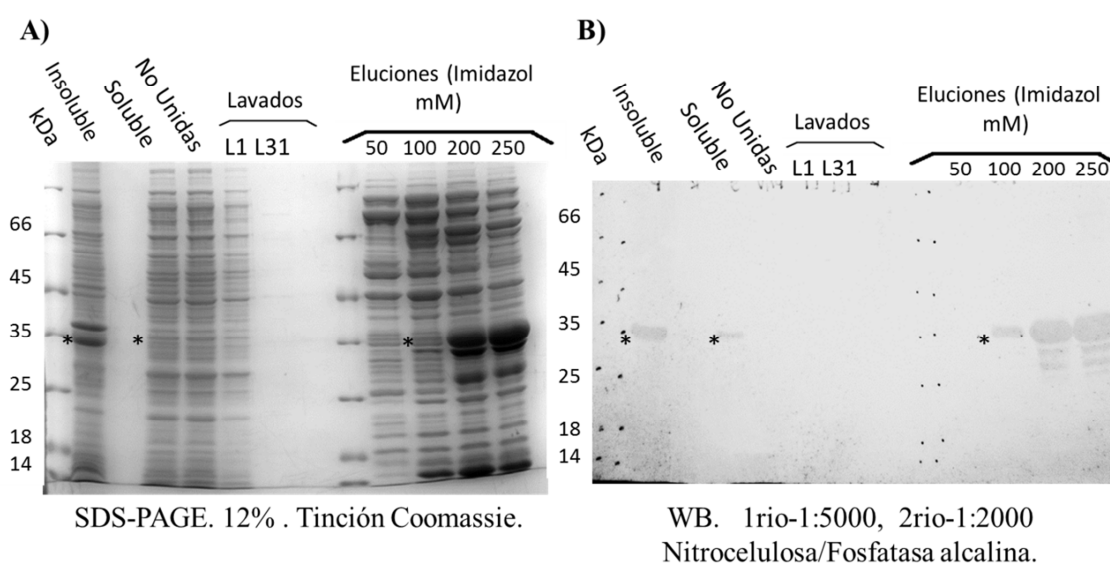


En la figura 2-16 es posible observar que los eluidos poseen una menor cantidad e intensidad de proteínas contaminantes en comparación con la cromatografía de la figura 2-13. Igualmente existe un enriquecimiento relativo de la banda de ~35kDa, que corresponde a la proteína recombinante. El resultado anterior indica que aumentar la concentración de proteína total 70 veces con respecto al volumen de cultivo, da lugar a eluidos más enriquecidos para la banda de ~35kDa que corresponde a la 6xHisTcNMNAT.

Para la estandarización de las condiciones de astringencia de la cromatografía de afinidad (concentración de imidazol en los *buffers* de unión, lavado y elución), se decidió por diseñar esquemas de elución escalonada, utilizando *buffers* de elución con distintas concentraciones de Imidazol. De esta manera, observando el perfil de los eluidos por SDS-PAGE y monitoreando la elución de la 6xHisTcNMNAT por *Western blot*, se puede obtener la proteína recombinante con un grado de pureza superior. Para el diseño de tales cromatografías escalonadas, se buscó realizar los lavados característicos de este proceso con un *buffer* que representase la menor condición de astringencia posible; y así retener al máximo la proteína 6xHisTcNMNAT. Por ello en los lavados se utilizó la misma concentración de imidazol que en el *buffer* de unión (10mM). Así mismo se empleó el factor de concentración estandarizado en el experimento de la figura 2-16.

En la figura 2-17 se observan el SDS-PAGE y el *Western blot* del primer esquema de elución escalonada llevado a cabo, en donde se realizaron 4 eluciones con concentraciones de 50mM, 100mM, 200mM y 250mM de imidazol, respectivamente. En todos los pasos de elución se utilizó un volumen del respectivo *Buffer* igual al volumen de resina empleado. En esta figura el *Western blot*, empleando anticuerpo anti-histidinas contra la 6xHisTcNMNAT, muestra que la proteína recombinante comienza a ser eluida a partir de los 100mM de imidazol. En los eluidos con 200mM y 250mM de imidazol observa un abundante enriquecimiento de la banda de ~35kDa de la proteína recombinante.

**Figura 2-17. Cromatografía de afinidad Ni-NTA de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT con elución escalonada.** A) SDS-PAGE al 12% (p/v) tinción azul de Coomassie. B) Ensayo de Western blot por fosfatasa alcalina (primario: IgGαHis 1:5000; secundario αHis-ratón 1:2000). Marcador de peso molecular, fracción insoluble, fracción soluble, Proteínas no unidas a la resina, primer lavado a 10mM de imidazol (L1), último lavado a 10mM de imidazol (L31) y eluciones a 50mM, 100mM, 200mM y 250mM de imidazol. Asterisco señala la proteína recombinante (~35kDa).

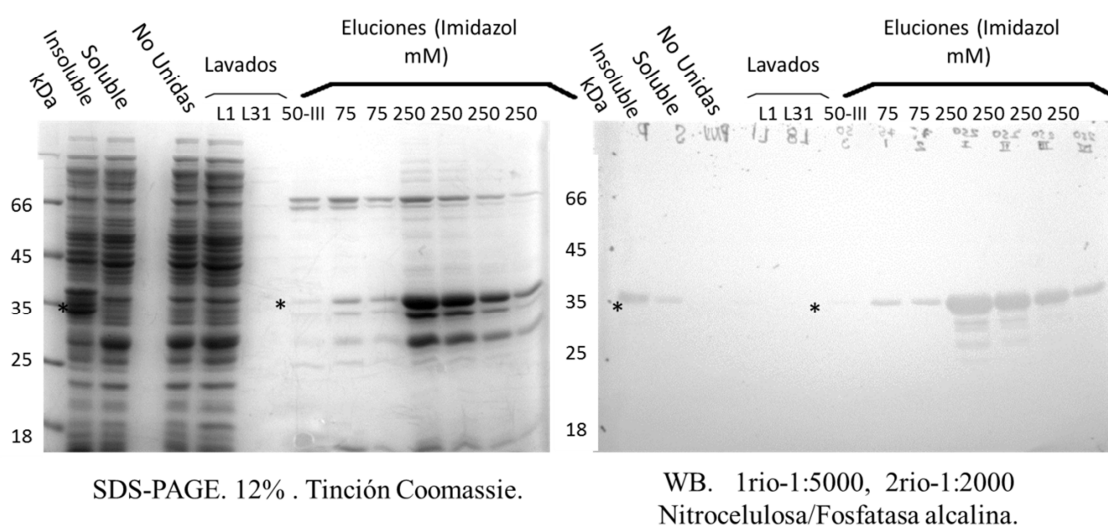


Se evidencian también ciertos productos de degradación de la 6xHisTcNMNAT en estos eluidos. En las eluciones con 200mM y 250mM de imidazol se observan numerosas proteínas contaminantes, no obstante la presencia de la banda correspondiente a la 6xHisTcNMNAT es muy superior, indicando claramente el enriquecimiento de la proteína recombinante en estas fracciones. En los carriles que corresponden a las proteínas no unidas a la resina y los lavados, no se detecta la proteína recombinante. Esto sugiere retención eficiente de proteína de interés en la resina. Por otra parte, en los eluidos visualizados por SDS-PAGE se observan distintos perfiles de proteínas contaminantes a distintas concentraciones de imidazol. A 50mM y 100mM se muestran bandas de mayor intensidad en lo que concierne a contaminantes de alto peso molecular.

Teniendo en cuenta el resultado anterior se realizó un nuevo esquema de elución escalonada a fin de eliminar contaminantes en los eluidos previos y obtener una fracción más pura en las eluciones finales. En esta cromatografía se realizaron tres eluidos con

50mM de imidazol, dos eluidos con 75mM de imidazol y 4 eluidos con 250mM de imidazol. Para las eluciones de 50mM se empleó el doble de volumen *Buffer* de elución con respecto al volumen de la resina. En los demás pasos se eluyó usando el mismo volumen de la resina, respecto al *Buffer* de elución. El resultado de dicha purificación se puede observar en la figura 2-18.

**Figura 2-18. Cromatografía de afinidad Ni-NTA de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT con elución escalonada. Eluciones con 50mM, 75mM y 250mM de imidazol.** A) SDS-PAGE al 12% (p/v) tinción azul de Coomassie. B) Western blot por fosfatasa alcalina (primario: IgG $\alpha$ His 1:5000; secundario  $\alpha$ His-ratón 1:2000). Marcador de peso molecular, fracción insoluble, fracción soluble, proteínas no unidas a la resina, primer lavado a 10mM de imidazol (L1), ultimo lavado a 10mM de imidazol (L31), tercera elución a 50mM de imidazol (50-III), eluciones a 75mM y eluciones a 250mM de imidazol. Asterisco señala la proteína recombinante (~35kDa).



En el *Western blot* de esta figura se puede detectar claramente la banda característica de ~35kDa de la proteína recombinante, a partir del primer eluido con 75mM. La intensidad ésta banda aumenta dramáticamente en el primer eluido de 250M; por lo cual se infiere que la 6xHisTcNMNAT se eluye mayormente a concentraciones de 250mM de imidazol. En el SDS-PAGE de la figura 2-18, es clara la reducción de proteínas contaminantes, en intensidad y numero, tomando como referente el esquema de elución anteriormente empleado (figura 2-17). No obstante aún se observan cuatro bandas principales: 2 de

~66kDa, una de ~27kDa y una de ~34kDa. Las proteínas de ~27kDa y ~34kDa se correlacionan espacialmente con los productos de degradación observados en el *Western blot* de la presente figura y en la figura 2-17; además son reconocidos por el anticuerpo empleado y se acumulan paulatinamente conforme las bandas de ~66kDa disminuyen en cantidad.

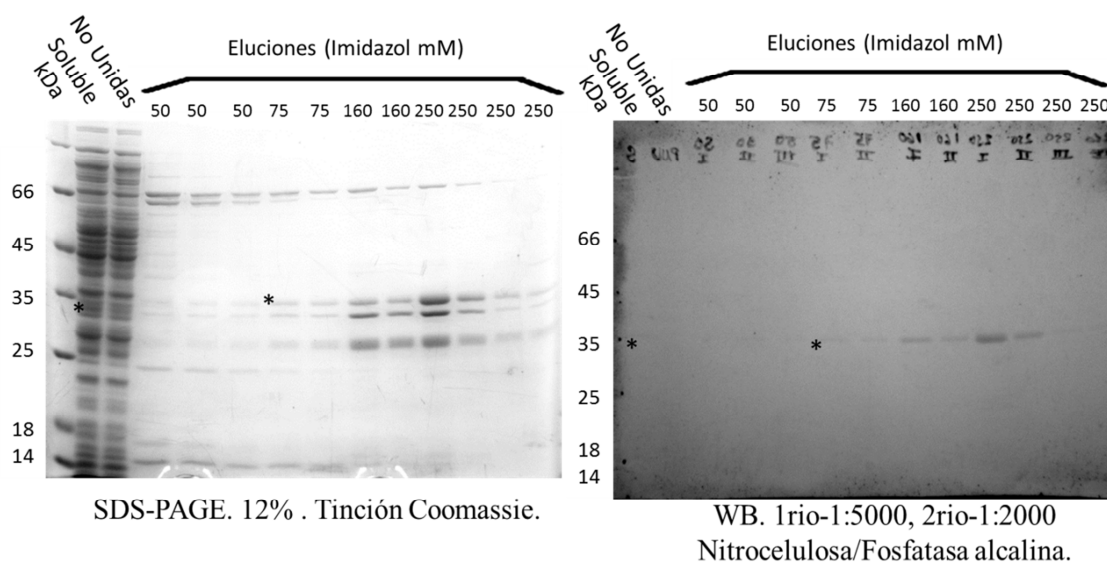
La presencia de las dos proteínas de ~66kDa, junto con las demás proteínas contaminantes de poca cantidad a lo largo de todo el carril de los eluidos, en la figura 2-18, motivó a optimizar aún más las condiciones de la elución escalonada. Por lo cual a continuación se realizó un último intento de eliminar los contaminantes mencionados en las eluciones finales dicha cromatografía. Para ello se realizó un esquema de elución en donde además de utilizar *buffers* de elución con concentraciones de 50mM, 75mM y 250mM de imidazol, se incluyeron dos eluciones con 160mM de imidazol. Estas eluciones se incluyeron después de las de 75mM pero antes de las eluciones con 250mM de imidazol. Adicionalmente se modificaron las relaciones de volumen entre respectivo *buffer* y la resina. En consecuencia las eluciones se llevaron a cabo de la siguiente manera:

- En las tres eluciones con 50mM de imidazol y en la elución con 75mM de imidazol, se utilizó un volumen de *buffer* de elución equivalente cuatro volúmenes de la resina
- En las eluciones restantes ( un eluido de 75mM, dos de 160mM y cuatro de 250mM de imidazol) se utilizó un volumen de *buffer* de elución equivalente dos volúmenes de la resina

Los resultados de esta cromatografía se presentan en la figura 2-19. En el SDS-PAGE se observa que los eluidos de 250mM se encuentran relativamente puros. También se observa que a partir de los tratamientos de 75mM se elimina casi por completo la banda inferior del par ubicado en la región de ~66kDa. Si bien el resultado de este experimento no es comparable con el de la figura 2-18 ya que los eluidos de 250mM se encuentran más diluidos, es claro que el aumento en el número de pasos de elución y en el volumen de *buffer* de elución por paso (en las primeras eluciones) contribuyeron a la disminución de la banda inferior del par de proteínas contaminantes 66kDa. Por otra parte, en el *Western blot* de esta misma figura se detecta solo la banda de la proteína de interés (~35kDa), y muy poco las bandas de ~34kDa y ~27kDa. Esto podría sugerir que las

bandas mencionadas (~34kDa y ~27kDa) no corresponden a productos de degradación de la 6xHisTcNMNAT. Sin embargo la “ausencia” de reconocimiento en el *Western blot*, puede ser un efecto de la dilución de las proteínas en los pasos de elución. De hecho, las bandas de ~35kDa ~34kDa y ~27kDa, son visibles en el SDS-PAGE desde el primer lavado a 50mM de imidazol, pero no se detecta nada en el *Western blot* sino hasta la elución a 75mM de imidazol. Por lo tanto puede ser que en las eluciones donde se visualiza la banda de ~35kDa, las bandas de ~34kDa y ~27kDa no se encuentran en una concentración suficiente como para ser inmuno-detectadas; aún más considerando que el anticuerpo solo reconoce la marca de histidinas en el extremo amino terminal.

**Figura 2-19. Cromatografía de afinidad Ni-NTA de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT con elución escalonada. Eluciones con 50mM, 75mM, 160mM y 250mM de imidazol.** A) SDS-PAGE al 12% (p/v) tinción azul de Coomassie. B) Western blot por fosfatasa alcalina (primario: IgGαHis 1:5000; secundario αHis-ratón 1:2000). Marcador de peso molecular, fracción soluble, proteínas no unidas a la resina, eluciones a 50mM, 75mM, 160mM y 250mM de imidazol. Asterisco señala la proteína recombinante (~35kDa).





Los resultados anteriores presentan diversas estrategias empleadas en aras de la purificación de la 6xHisTcNMNAT. No todas las aproximaciones abordadas llevaron a resultados concluyentes; no obstante la estandarización de un esquema de elución escalonada en una cromatografía de afinidad a Ni-NTA, junto con ciertas modificaciones en el proceso de lisis, permitió exitosamente la purificación parcial de la proteína recombinante de interés. Esto se considera de vital importancia, para proceder eventualmente con caracterización de su actividad enzimática.

### 2.2.5 Determinación de la actividad enzimática de la 6xHisNMNAT.

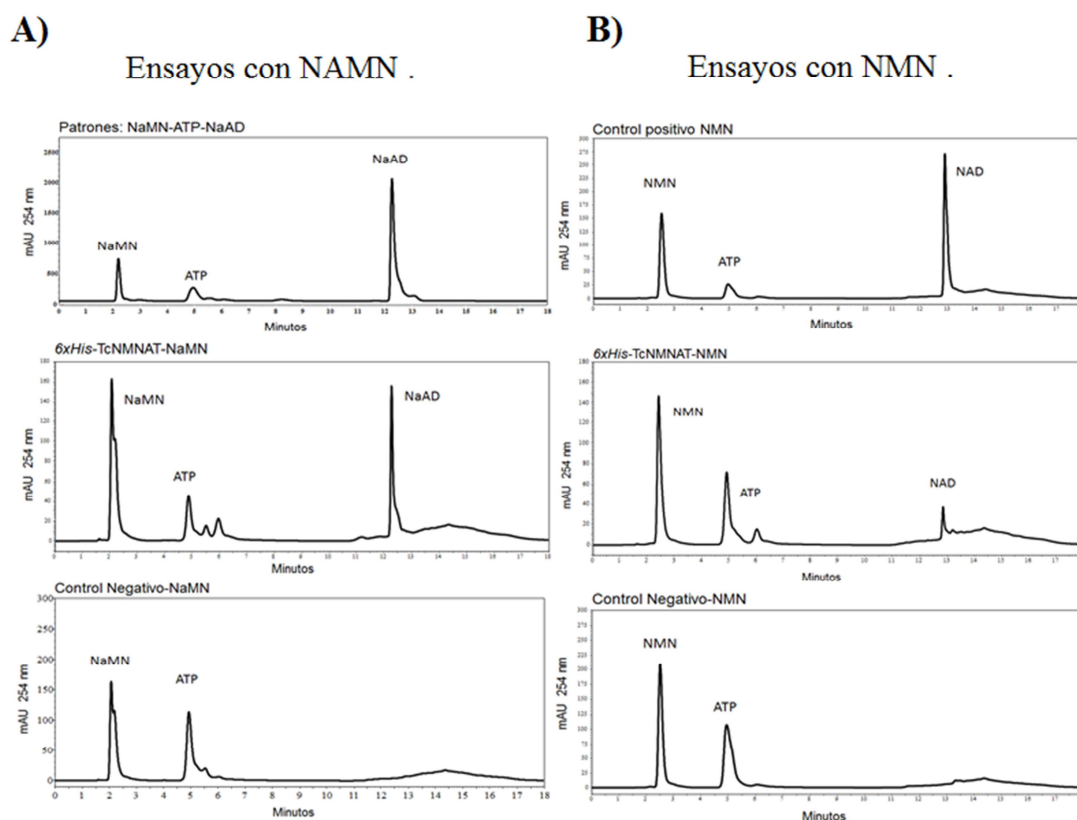
Paralelamente a la purificación de la proteína recombinante se buscó detectar su actividad enzimática, partiendo de los distintos eluidos de las cromatografías de afinidad mencionadas en el capítulo anterior. Con tales eluidos se realizaron ensayos de actividad directos evaluados por RP-HPLC; utilizando como condiciones 37°C de temperatura, un pH de 7,3 y diferentes volúmenes de eluido en la reacción. Mediante la constatación de la actividad enzimática se podría entonces confirmar identidad de la 6xHisTcNMNAT como una enzima de la familia de las NMNAT. Inicialmente se efectuaron múltiples ensayos enzimáticos, los cuales fueron infructuosos a pesar de probar con distintos volúmenes del eluido en la reacción del ensayo. Por lo tanto, se concluyó que la calidad del eluido, respecto a su pureza y concentración de proteína recombinante, podría estar impidiendo la detección de la actividad enzimática de la 6xHisTcNMNAT. Posteriormente se realizaron ensayos enzimáticos empleando los eluidos la cromatografía de afinidad mostrada en la figura 2-16, en la cual se había aumentado el factor de concentración de 50 a 70 veces. Igualmente se evaluaron eluidos carentes de vector, en los cuales no se observó actividad.

En la figura 2-20, se observan los ensayos de actividad evaluados por RP-HPLC con los eluidos mencionados. En estos ensayos se utilizaron los dos sustratos normalmente usados por la familia de las NMNAT; el Mononucleótido de Nicotinamida (NMN) y el Mononucleótido de ácido nicotínico (NAMN). Como control positivo se utilizó la 6xHisHsNMNAT1 (una isoenzima humana de la TcNMNAT) y como control negativo se sustituyó la enzima por solo *buffer* de elución a 250mM de imidazol.

En los cromatogramas correspondientes a los controles positivos, se muestran tres picos cuyos tiempos de elución corresponden a los dos reactantes de la reacción (ATP, NAMN o NMN) y el respectivo producto de la misma (NAAD o NAD, respectivamente). Los ensayos enzimáticos donde se evalúa la actividad de la 6xHisTcNMNAT muestran el mismo patrón de picos presente en los controles positivos. Esto implica que para los tratamientos de la 6xHisTcNMNAT se observa un pico congruente con el producto principal de la reacción catalizada (NAAD o NAD según el sustrato utilizado); de acuerdo

con los tiempos de retención observados (12,08 minutos para el NAAD y 12,8 para el cado del NAD). Este resultado evidencia la actividad enzimática de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT parcialmente purificada, e identifica al candidato estudiado como la primera NMNAT en *Trypanosoma cruzi*.

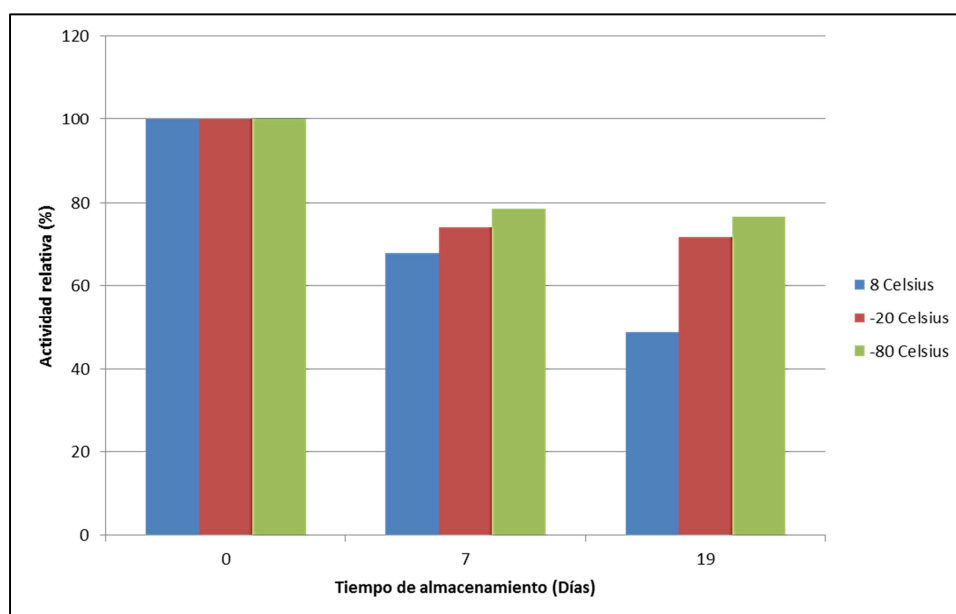
**Figura 2-20. Determinación de la actividad enzimática de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT.** Ensayos realizados con los sustratos A) NAMN y ATP, y B) NMN y ATP. Se observan de Arriba abajo: Controles positivos (ensayos con la 6xHisHsNMNAT), ensayos con la 6xHisTcNMNAT. Controles Negativos (Ensayo con *buffer* de elución).



Considerando la inestabilidad característica de las NMNAT y dada la necesidad de proteína recombinante para la caracterización enzimática, se buscaron establecer las condiciones de almacenamiento.

Esta determinación llevó a cabo realizando ensayos enzimáticos a distintos tiempos de almacenamiento bajo tres condiciones diferentes: 4°C, 20°C bajo cero y 80°C bajo cero; con alícuotas equivalentes de los eluidos del esquema de purificación mostrado en la figura 2-18. En la figura 2-21 se muestran los niveles de actividad enzimática de las tres condiciones empleadas a distintos tiempos de almacenamiento; tomando el día 0 como el 100% de la actividad. Esta figura permite inferir que la pérdida de actividad enzimática en función de la medición inicial es mayor a 4°C, mientras que a 20°C u 80°C bajo cero tales pérdidas de actividad son mucho menos significativas; siendo ligeramente menor en el caso de 80°C bajo cero. Con base en este resultado los eluidos almacenaron en alícuotas distintas a -80°C para posteriores ensayos.

**Figura 2-21. Determinación de temperaturas de almacenamiento de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT.** Azul) Actividad relativa de eluidos almacenados a 8°C. Rojo) Actividad relativa de eluidos almacenados a -20°C. Verde) Actividad relativa de eluidos almacenados a -80°C. Mediciones realizadas a los 0, 7 y 19 días desde la purificación del eluido.



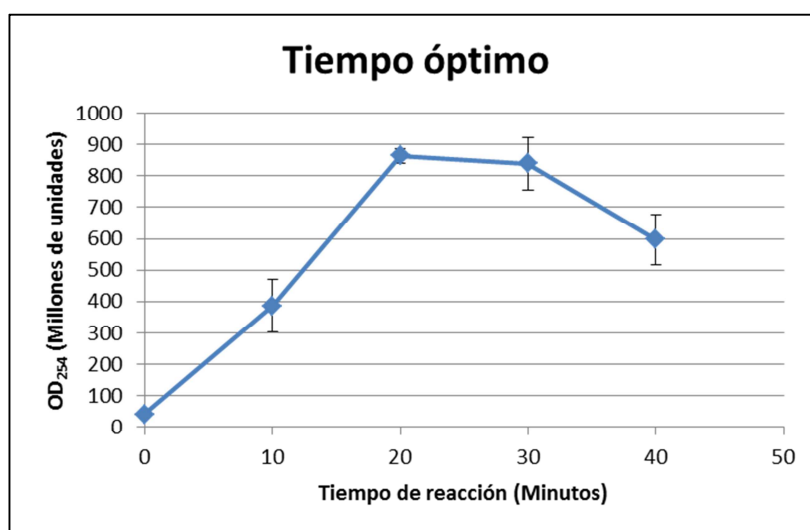
### 2.2.6 Caracterización de la actividad enzimática de la 6xHisTcNMNAT.

Para la caracterización cinética de la 6xHisTcNMNAT, en primera instancia se realizaron ensayos a fin de determinar el tiempo propicio en que la reacción catalizada poseyera un comportamiento lineal; junto con las condiciones óptimas de temperatura y el pH para el desarrollo de la misma.

La determinación del tiempo de la reacción catalizada se evaluó midiendo la producción de  $\text{NAD}^+$  en función del tiempo, mediante ensayos enzimáticos directos analizados por RP-HPLC. Para ello se consideró el área del pico de elución correspondiente al tiempo de retención del  $\text{NAD}^+$ , de acuerdo con los patrones empleados a una longitud de onda de 254nm. Todos los ensayos enzimáticos se efectuaron a una temperatura de reacción de  $37^\circ\text{C}$  y a un pH de 7,5. En total se realizaron dos series de tratamientos: una curva de progreso con 1,25 $\mu\text{g}$  de enzima y 5mM de sustratos (ATP y NMN), y una segunda curva usando 0,25 $\mu\text{g}$  de enzima y 1mM de sustratos. Esta última se registra en la figura 2-22.

En esta figura se puede ver la variación en la actividad enzimática de los tratamientos correspondientes a 0, 10, 20, 30 y 40 minutos de reacción. Es claro que después de los 20 minutos de reacción se observa una repentina disminución en el incremento paulatino de la actividad (producción de  $\text{NAD}^+$ ). En consecuencia este resultado sugiere que entre los 0 y los 20 minutos la reacción catalizada consta de una cinética lineal. Por lo cual el tiempo propicio para realizar posteriores ensayos enzimáticos se encontraría por debajo de los 20 minutos. De igual manera en el tratamiento de 40 minutos se registra una actividad menor que la de los 30 minutos. Este resultado totalmente inesperado podría sugerir inestabilidad o degradación de la enzima en un lapso cercano a los 40 minutos, bajo las condiciones de este experimento en particular. Cabe notar que para el experimento análogo con 1,25 $\mu\text{g}$  de enzima y 5mM de sustratos también se observó linealidad hasta llegados los 20 minutos de reacción. No obstante se tomaron como referente inicial las condiciones presentadas en la figura 2-22, buscando economizar material y para alcanzar una saturación más temprana de los sustratos a evaluar (ATP y NMN) en la fase de determinación de constantes cinéticas.

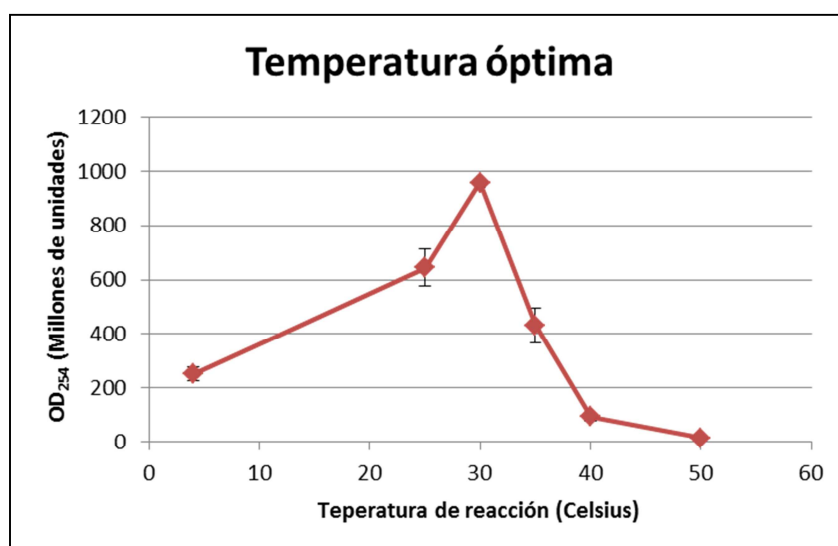
**Figura 2-22. Actividad de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en función del tiempo.** Unidades de absorbancia para el NAD<sup>+</sup> desde 0 a 40 minutos de reacción. Cantidad de Enzima: 0,25µg. Concentración de sustratos (ATP y NMN): 1mM. Tratamientos por triplicado.



La determinación de la temperatura óptima del ensayo, se realizó evaluando la producción de NAD<sup>+</sup> (como se menciona en párrafos anteriores) en función de diferentes temperaturas de incubación de la reacción, a un pH de 7,5, en un lapso de 15 minutos y utilizando 0,25µg de enzima. Dicho comportamiento se puede observar en la figura 2-23.

De acuerdo con este resultado, conforme la temperatura se acerca hacia los 30°C se registra la mayor actividad enzimática por parte de la 6xHisTcNMNAT, siendo esta la temperatura óptima para posteriores ensayos dentro de la escala empleada.

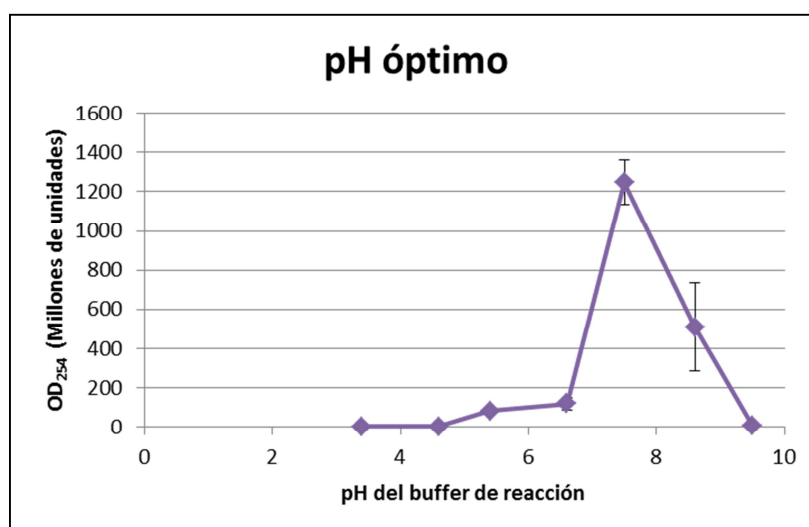
**Figura 2-23. Actividad de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en función de la temperatura.** Unidades de absorbancia para el  $\text{NAD}^+$  desde temperaturas de 4°C a 50°C para la incubación de la reacción. Tratamientos por triplicado.



Para la determinación de pH óptimo se evaluó la producción de  $\text{NAD}^+$  en tratamientos con *buffers* de reacción de distinto pH (utilizando valores de 3,4 hasta 9,5), bajo una temperatura de 30°C, un tiempo de reacción de 15 minutos y usando 0,25µg de enzima; tal y como se observa en la figura 2-24.

Como se puede ver en esta figura, a pesar de la enorme barra de error en el tratamiento de pH 8,6 Esta no se traslapa con aquella del tratamiento de pH 7,5. Esto sugiere que el pH de 7,5 es tentativamente el pH óptimo para la catálisis de la reacción. Lo cual concuerda con los valores de pH fisiológicos en el parásito.

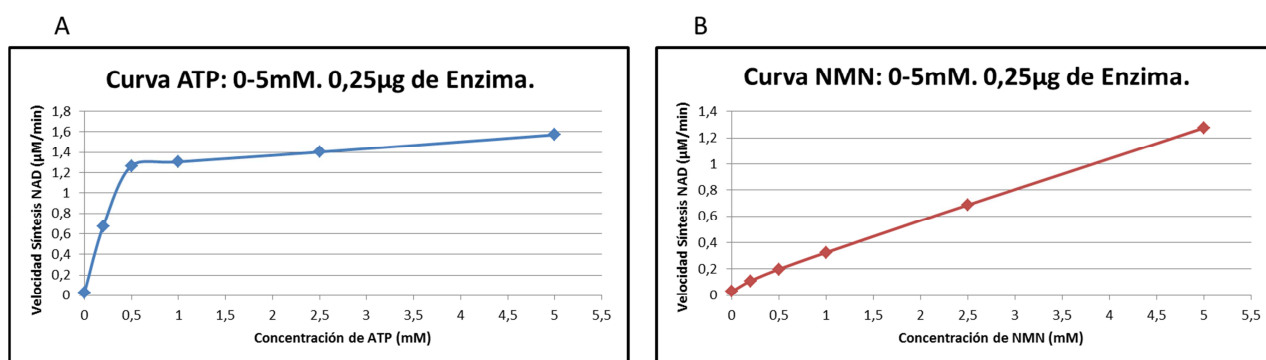
**Figura 2-24. Actividad de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT en función del pH.** Unidades de absorbancia para el NAD<sup>+</sup> en función de valores de pH de 3,4 a 9,5 para el *buffer* de reacción. Tratamientos por triplicado.



Ya habiendo estandarizado los parámetros para el desarrollo de la reacción en el ensayo de actividad, se procedió a hallar las constantes cinéticas de la 6xHisTcNMNAT para dos de sus sustratos principales; el ATP y el NMN. Inicialmente se realizó una evaluación preliminar de la cinética de esta enzima en función de las concentraciones iniciales de cada uno de los sustratos mencionados, a fin de obtener un rango de concentraciones iniciales en donde se pudiese observar la “saturación” típica de una enzima con una cinética de *Michaelis-menten*. Para estos ensayos se emplearon las condiciones previamente establecidas (15 minutos, 30°C, pH 7,5 y 0,25µg de enzima) y al tratarse de una enzima bi-sustrato, en los tratamientos con distintas concentraciones iniciales del sustrato a evaluar se mantuvo una concentración constante y en exceso del otro sustrato (sustrato en saturación). El rango de concentraciones vario de 0 a 5mM respecto al sustrato evaluado y el sustrato en saturación se mantuvo a 5mM. En la figura 2-25 se pueden observar las mencionadas evaluaciones preliminares.



**Figura 2-25. Evaluación preliminar para la determinación de constantes cinéticas de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT.** Comportamiento de la velocidad de síntesis de NAD<sup>+</sup> en función de la concentración inicial de sustrato: A) ATP de 0 a 15mM (sustrato en saturación NMN 5mM) y B) NMN de 0 a 5mM (sustrato en saturación ATP 5mM). Cantidad de enzima: 0,25µg.



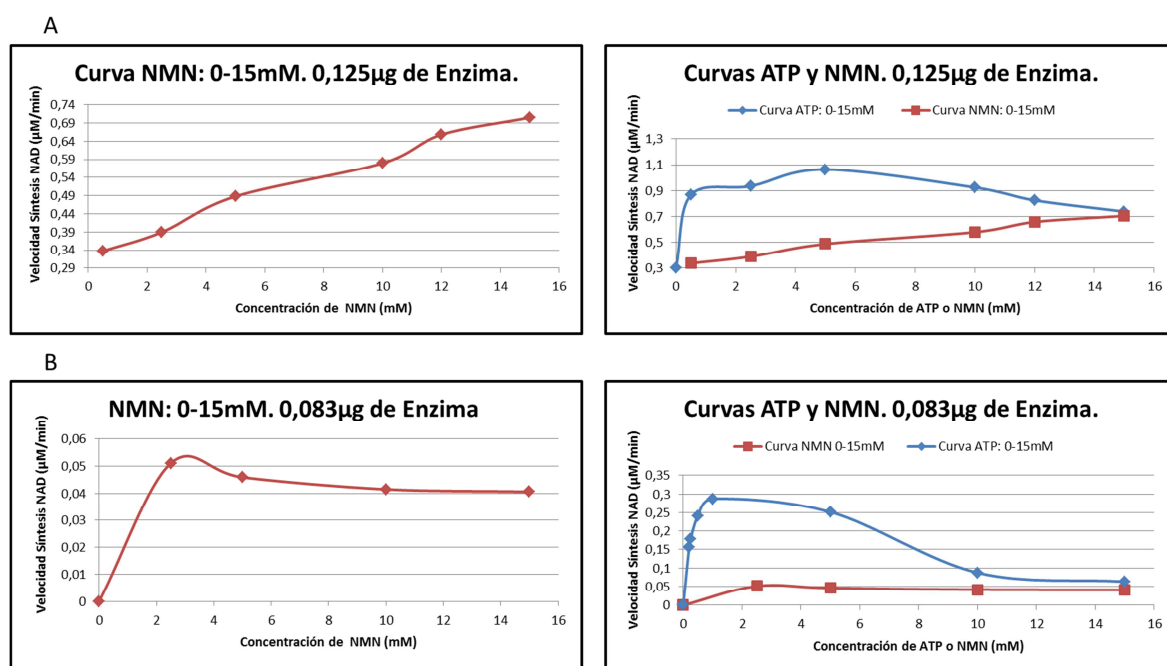
En esta figura es evidente que en el caso de ATP, el comportamiento de la velocidad señala una cinética de saturación. Esto implica que para este sustrato, el rango de concentraciones iniciales empleado es idóneo para la determinación de sus respectivas constantes cinéticas. Sin embargo en el caso del NMN se observa aún una dependencia lineal entre la velocidad de catálisis y la concentración inicial de sustrato. Lo que por el contrario indica que el rango actual de concentraciones de NMN no cubre por completo el desarrollo de la cinética de saturación que la curva debería presentar. Por esta razón realizó el mismo experimento pero ampliando dicho rango de concentraciones para el NMN, de 0 a 12mM. El resultado de dicho experimento fue a grandes rasgos, el mismo presentado en la figura 2-25, pues la curva correspondiente al NMN seguía presentando una dependencia lineal entre la velocidad y la concentración de sustrato, mientras que su respectivo “control” (la curva correspondiente al ATP) seguía presentando una cinética de saturación.

A raíz de tal resultado se optó por ampliar aún más el rango de concentraciones iniciales del NMN y variar las cantidades de enzima, bajo las mismas condiciones de temperatura, pH y tiempo ya establecidas. En este nuevo experimento se realizaron tratamientos desde 0 hasta 15mM respecto al sustrato evaluado, mientras que el sustrato en saturación se mantuvo a 15mM; y además se usaron cantidades de enzima equivalentes

a la mitad (0,125 $\mu$ g) y aproximadamente un tercio (0,083 $\mu$ g) de la cantidad inicialmente establecida para la caracterización. Esto se efectuó esperando que la velocidad máxima del sistema disminuyese y en consecuencia se pudiese observar una saturación de la enzima dentro del nuevo rango de concentración establecido. Cabe notar también que por cada curva en función de la concentración del NMN, se realizó una curva “control” en función de la concentración de ATP. Dicha curva se encontraba bajo el mismo set de condiciones (rango de concentraciones del sustrato a evaluar, concentración de sustrato en saturación y concentración de enzima) que su respectiva curva en función del NMN. El último tratamiento de ambas curvas poseía las mismas concentraciones de NMN y ATP (15mM), siendo igual tanto para curva control como para la curva del NMN; en consecuencia la velocidad de la reacción para este último tratamiento debería ser igual para las dos curvas proporcionándonos un comparativo extra en el experimento. El resultado de este experimento se puede observar en la figura 2-26.

En esta figura se muestra el aspecto de la velocidad de la reacción en función de la concentración inicial de NMN y comparación a escala, con la curva control del ATP; todo esto bajo dos concentraciones distintas de enzima. En la parte izquierda de la figura se observa claramente que a 0,125 $\mu$ g de enzima el sistema no se ha saturado aún, mientras que a 0,083 $\mu$ g de enzima se observa una cinética de saturación para el NMN. El problema surge al comparar las curvas de saturación para el NMN con las respectivas curvas control. En la parte derecha de la figura, las velocidades del último tratamiento para ambas curvas constan de velocidades prácticamente iguales como se esperaba desde un principio. No obstante la curva control se desvía de aspecto estándar de una cinética de *Michaelis*, disminuyendo su velocidad a altas concentraciones de sustrato, para así coincidir con la curva del NMN. En la curva control con 0,125 $\mu$ g de enzima, esta tendencia es leve y podría deberse al error propio del experimento, pero para curva control con 0,083 $\mu$ g de enzima dicha tendencia a la baja es notoria. El comportamiento de la curva control en el sistema genera serias dudas sobre la saturación que se observa para el NMN a 0,083 $\mu$ g de enzima (figura 2-26 B); puesto que para esta curva la concentración de sustrato en saturación (ATP) es de 15mM desde el primer tratamiento, y esta concentración de ATP en la curva control muestra una velocidad que en principio no debería presentarse.

**Figura 2-26. Curva de saturación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el NMN con ATP como sustrato en saturación (15mM).** Izquierda: velocidad de síntesis de NAD en función de la concentración inicial de NMN de 0 a 15mM (sustrato en saturación ATP 15mM). Derecha: Comparación con la curva control (ATP de 0 a 15mM; sustrato en saturación NMN 15mM). A) Ensayos con 0,125µg de enzima, B) Ensayos con 0,083µg de enzima.



El comportamiento anómalo de la curva control en la figura 2-26 sugiere que posiblemente el ATP a altas concentraciones inhibe la reacción enzimática. De ser así, el comportamiento de la curva para el NMN no sería fidedigno, pues estaría influenciado por dicha inhibición. A fin de resolver este inconveniente se plantearon inicialmente dos explicaciones alternativas al comportamiento de la curva control en el experimento anterior:

- *Las altas concentraciones de ATP alteran el pH del sistema, más allá de la capacidad del buffer empleado en el ensayo enzimático:* Una mezcla equimolar de ATP y  $\text{MgCl}_2$  contiene proporciones apreciables de iones  $\text{MgATP}^{2-}$ ,  $\text{ATP}^{4-}$  y  $\text{HATP}^{3-}$ ; estas especies son producto de la ionización del ATP (Storer and

Cornish-Bowden 1976) dado el carácter ácido de sus grupos fosfato. Esto abre la posibilidad de que a altas concentraciones de ATP se supere la estabilidad generada por el *buffer* y se acidifique el pH del sistema; lo cual afectaría la actividad de la enzima. De ser así, la concentración actual del *buffer* empleado en el ensayo de actividad (HEPES 25mM) sería suficiente para mantener el pH deseado.

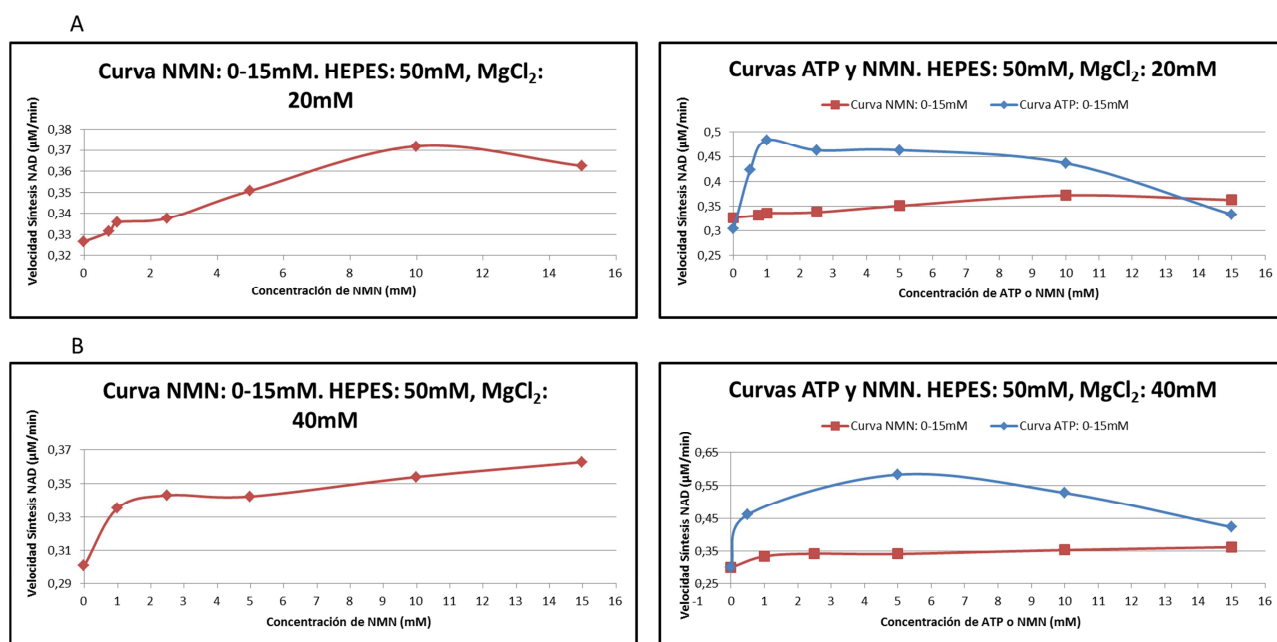
- *Las altas concentraciones de ATP afectan la disponibilidad cofactor ( $Mg^{2+}$ ) o sustrato ( $MgATP^{2-}$ ), limitando la actividad enzimática de la enzima.* El ATP existe mayormente como  $MgATP^{2-}$  (80%) en soluciones donde la concentración de  $MgCl_2$  excede a la concentración total de ATP por 1 a 10mm; sin embargo dicha proporción de  $MgATP^{2-}$  varía enormemente si las concentraciones de  $MgCl_2$  y ATP salen de este rango (Storer and Cornish-Bowden 1976). Teniendo en cuenta que la concentración de  $MgCl_2$  en el ensayo (10mM) se encuentra por debajo de la concentración de ATP (15mM) podrían presentarse dos escenarios: en el primero se quelaría la mayoría del  $Mg^{2+}$  dejando a la enzima sin cofactor; en el segundo caso se afectaría la concentración de  $MgATP^{2-}$  y dado que este complejo es esencial para la utilización del ATP como sustrato, esto también disminuiría la actividad de la enzima. Por lo tanto en ambos casos la concentración actual de  $MgCl_2$  podría estar afectando la realización del ensayo.

Ambas hipótesis sugieren que de aumentarse la capacidad *buffer* y la concentración de  $MgCl_2$  del sistema, la actividad enzimática no se vería afectada a altas concentraciones de ATP y no se presentaría el comportamiento observado en la curva control de la figura 2-26. Por esta razón se efectuó un nuevo experimento en donde se observó el comportamiento de la velocidad de la reacción en función de sustrato NMN y el sustrato de la curva control (ATP). Pero esta vez se dobló la concentración de *buffer* (HEPES 50mM) y se utilizaron dos concentraciones de  $MgCl_2$  equivalentes al doble (20mM) y al cuádruple (40mM) de la concentración inicial; tal y como se observan en la figura 2-27.

En los experimentos correspondientes a la mencionada figura se utilizó una cantidad de enzima de 0,083μg, dado que esta fue la condición en donde se observó un detrimento notorio en la velocidad (figura 2-26 B). No obstante para la condición observada en el

aparato A de la figura 2-27, también se realizó un experimento idéntico pero utilizando 0,125 $\mu$ g de enzima. En este experimento el comportamiento para la curva control fue el mismo que el observado la figura 2-27.

**Figura 2-27. Curva de saturación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el NMN bajo mayores concentraciones de buffer HEPES y  $MgCl_2$ .** Izquierda: velocidad de síntesis de NAD en función de la concentración inicial de NMN desde 0 a 15mM (sustrato en saturación ATP 15mM). Derecha: Comparación con la curva control (ATP de 0 a 15mM; sustrato en saturación NMN 15mM). Cantidad de enzima: 0,083 $\mu$ g. A) Ensayos con 50mM de HEPES y 20mM de  $MgCl_2$ , B) Ensayos con 50mM de HEPES y 40mM de  $MgCl_2$ .



En la figura de este experimento se observa en el apartado A, las velocidades del último tratamiento (para la curva del NMN y la curva control) siguen siendo similares, pero a costa de una caída en la velocidad en la curva correspondiente al ATP. Aunque cualitativamente la disminución es menos abrupta para la misma cantidad de enzima, en comparación con la curva control de la figura 2-26, se sigue presentando una desviación de la cinética de *Michaelis* a altas concentraciones de ATP. Esto igualmente genera

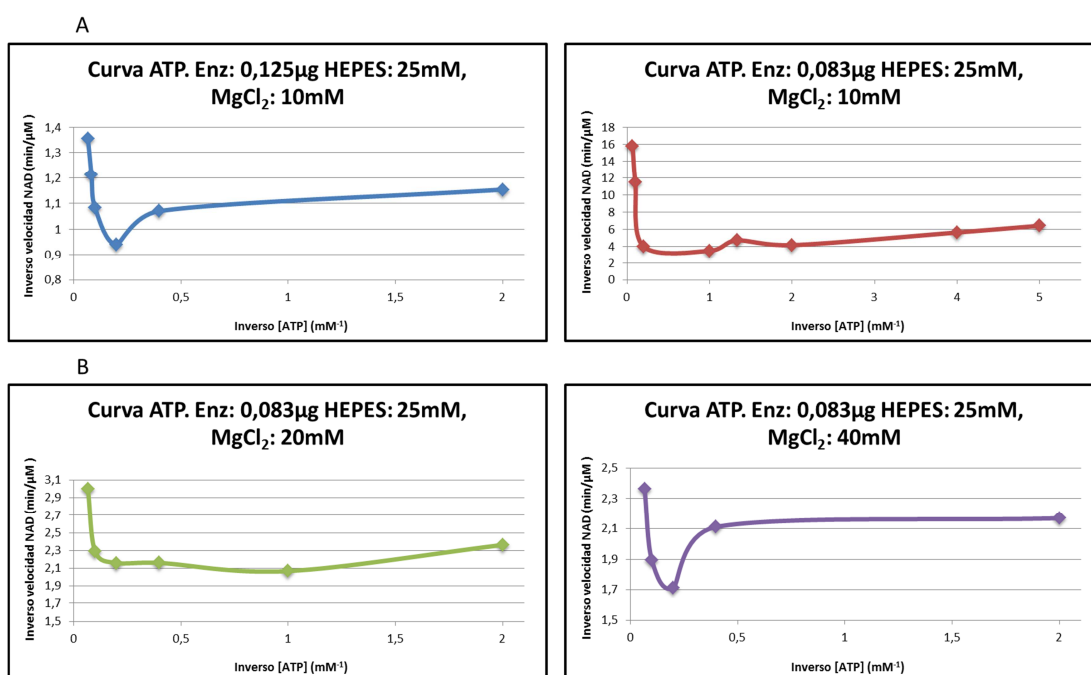
dudas sobre la saturación observada para la curva del NMN en la parte izquierda del segmento A de presente figura. En el apartado B de esta figura 2-27, se observa que el aumento en la concentración de  $\text{MgCl}_2$  a 40mM no conlleva a una mejora sustancial en el comportamiento de la curva control; a pesar de que los valores de la velocidad en los puntos con 5 y 10mM de ATP de la curva control, son mayores a 40mM (figura 2-27 B) que a 20mM de  $\text{MgCl}_2$  (figura 2-27 A). En conclusión este experimento indica que doblar la concentración de *buffer* HEPES y así mismo aumentar la concentración de  $\text{MgCl}_2$  entre el rango de 20 a 40mM, no mejora ni perjudica el comportamiento anómalo de la curva control. Cabe notar que en general las velocidades para los puntos de ambas curvas de la figura 2-27, son mayores que los valores los puntos en las curvas de la figura 2-26; por lo que es posible que el aumento de la capacidad *buffer* y el incremento la concentración de  $\text{MgCl}_2$  a una proporción por encima de la concentración máxima de ATP, sean condiciones que proporcionen una mayor estabilidad al sistema. Aun si esto no fuese cierto, al parecer tampoco ejercen una influencia negativa en el desarrollo de la reacción. En consecuencia para posteriores experimentos se optó por mantener una concentración de *buffer* HEPES de 50mM y una concentración de  $\text{MgCl}_2$  de 20mM, en aras de evitar posibles inconvenientes futuros relacionados con la inestabilidad el pH o el quelamiento excesivo del ion Magnesio.

Teniendo en cuenta el resultado anterior, se consideró una tercera hipótesis que explicase la desviación de la curva control de la cinética de *Michaelis*. Esta vez se consideró una posible inhibición por sustrato. Este fenómeno se caracteriza por la aparición de valores de velocidad menores a los esperados, bajo altas concentraciones iniciales del sustrato a evaluar (Copeland 2004); un perfil que encaja perfectamente con lo que ocurre para la curva control en los experimentos anteriores. La inhibición por sustrato no solo puede detectarse por su aspecto anómalo en un gráfico de *Michaelis*; sino que además este comportamiento puede corroborarse por medio de gráficos de *Lineweaver-Burk*. Por lo tanto se graficaron los dobles recíprocos para las curvas control (ATP) de los resultados de las figuras 2-26 y 2-27; estos se muestran en la figura 2-28.

De acuerdo con la figura 2-28 todos los gráficos de dobles recíprocos muestran un comportamiento común y singular; una curvatura hacia arriba en los valores más pequeños del inverso de la concentración (eje horizontal). Esta dramática curvatura

hacia arriba en las regiones cercanas al eje Y, es algo que caracteriza a una enzima que presenta inhibición por sustrato respecto los gráficos de dobles recíprocos (Copeland 2004). Entonces, lo que sugieren gráficos de *Michaelis* y *Lineweaver-Burk* es que el sustrato ATP es quien inhibe el proceso de catálisis desde concentraciones cercanas a los 10mM. Dado que la enzima es bi-sustrato, en las curvas para la saturación del NMN se utilizaron concentraciones del sustrato en saturación (ATP) de 15mM. Esto conlleva a que el desarrollo del proceso catalítico en todos los tratamientos se encuentre parcialmente impedido desde el inicio del ensayo y en consecuencia el desarrollo de la velocidad en función de la concentración de NMN no sea óptimo ni represente una situación real.

**Figura 2-28. Gráficos de Lineweaver-Burk para las curvas de saturación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT con el sustrato ATP de las figuras 2-26 y 2-27.** A) Dobles recíprocos para las curva control de la figura 2-26, B) Dobles recíprocos para las curva control de la figura 2-27.

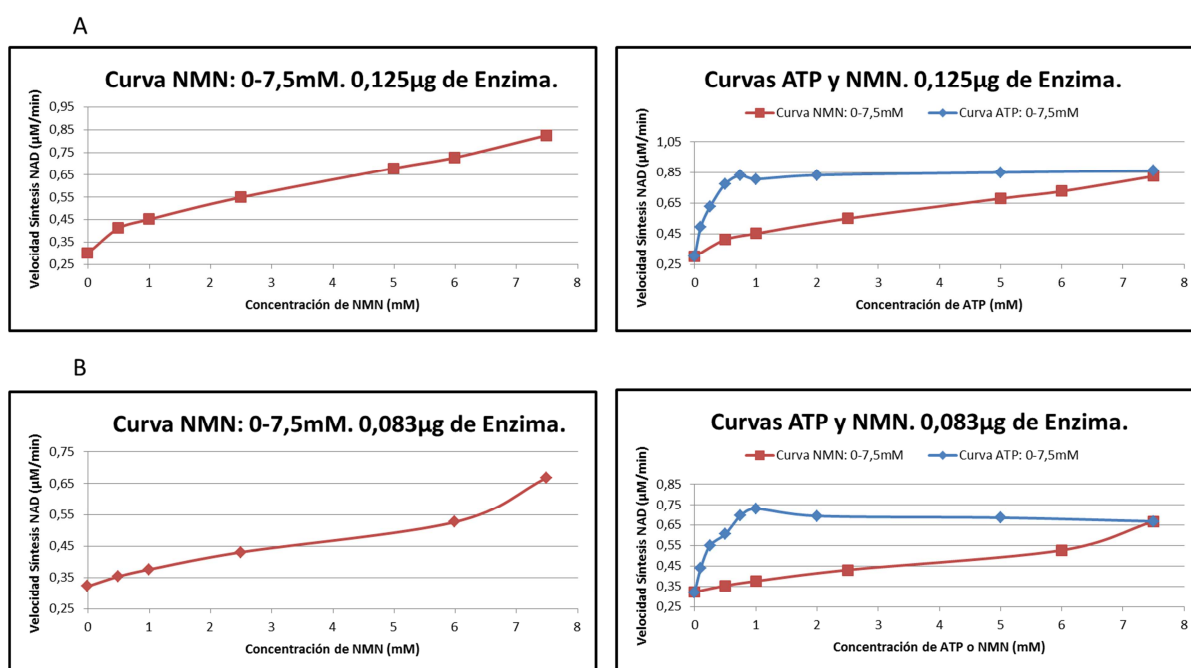


La confirmación de una inhibición por parte ATP, obligó en primera instancia a replantear el desarrollo de los experimentos para conseguir la saturación del NMN; pues si bien en

un principio se pensó en aumentar el rango de concentraciones del sustrato a evaluar (y con ello la concentración el sustrato ATP en saturación) y en disminuir la cantidad de enzima del ensayo, la primera opción ya no es posible dada la inhibición por sustrato.

Por ello se desarrolló un nuevo experimento en donde se buscó estandarizar la curva de saturación para el NMN utilizando un rango menor a 10mM en dicha evaluación. Para ello se empleó un rango de concentraciones desde 0 hasta 7,5mM de NMN, junto con una concentración de sustrato en saturación ATP de 7,5mM. También se utilizó una concentración de *buffer* HEPES de 50mM, a fin de garantizar mayor estabilidad de pH en el ensayo, y una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 20mM; un valor apenas superior al rango planteado por Storer y Cornish-Bowden (1976). De igual manera se realizó una curva control con el ATP (mismo rango y concentración de sustrato en saturación) y se emplearon dos cantidades de enzima como en experimentos anteriores. El correspondiente resultado se puede apreciar en la figura 2-29.

**Figura 2-29. Curva de saturación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el NMN con ATP como sustrato en saturación (7,5mM).** Izquierda: velocidad de síntesis de NAD en función de la concentración inicial de NMN de 0 a 7,5mM (sustrato en saturación ATP 7,5mM). Derecha: Comparación con la curva control (ATP de 0 a 7,5mM; sustrato en saturación NMN 7,5mM). A) Ensayos con 0,125µg de enzima, B) Ensayos con 0,083µg de enzima.





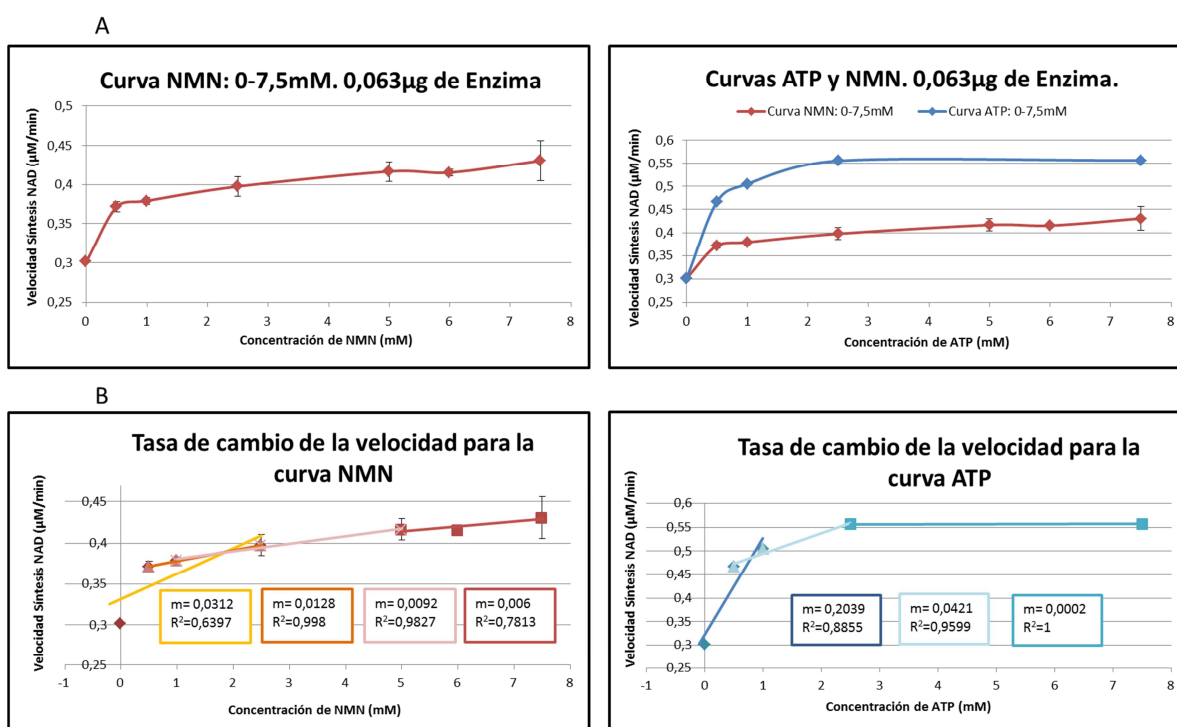
El resultado de esta figura muestra claramente que la curva control ya no presenta la un comportamiento de inhibición como el observado anteriormente con concentraciones superiores a 10mM de ATP; lo cual indica que el rango empleado es propicio para la determinación de constantes cinéticas. En gráfico de la velocidad en función del NMN ya no se observa una saturación evidente, como si se puede observar en experimentos anteriores donde se mantuvo la concentración de sustrato en saturación (ATP) a 15mM (especialmente aquellos con 0,083 $\mu$ g de enzima). Este resultado muestra por un lado que los presuntos comportamientos de saturación observados en los experimentos anteriores eran erróneos; no obstante también indica que aún no se ha logrado una saturación para el NMN bajo estas condiciones.

Dado que no era posible aumentar el rango de concentraciones del NMN se buscó esta vez reducir aún más la cantidad de enzima para poder observar la saturación con este sustrato. En esta ocasión se usaron 0,063 $\mu$ g de enzima bajo las condiciones estandarizadas en los anteriores experimentos. El correspondiente resultado se puede observar en la figura 2-30.

En el apartado A de esta figura se puede observar que para la curva control hay una cinética de saturación clara, mientras que en el caso del NMN se presenta un comportamiento que bien podría indicar la saturación de la enzima con el sustrato en cuestión. Para estar seguros se observaron los datos numéricos de la velocidad de la curva del NMN y el resultado se encuentra representado en el apartado B de la figura 2-30. Aquí se ilustran las regresiones lineales de grupos de tratamientos (puntos) que constituyen distintos segmentos de la curva del NMN y la curva control según el caso. En cada gráfico se muestran valores de la pendiente (que representa el cambio de la velocidad en función de la concentración, para dicho segmento) y el coeficiente de correlación de la regresión lineal para el segmento en cuestión. Lo importante de la representación de la figura 2-30 B, radica en que para la curva control (ATP) el cambio en la velocidad disminuye tendiendo a cero mientras la concentración de sustrato aumenta, y lo mismo ocurre con la curva del NMN. Esto indica para en los tratamientos con mayor concentración de sustrato a evaluar, la velocidad se puede considerar como independiente del aumento de la concentración inicial (Copeland 2004). Esto nos permite afirmar que en el caso del NMN se observa la saturación de la enzima en

cuestión con este sustrato; por lo cual se cuenta con una curva lo suficientemente completa para la determinación de las constantes cinéticas.

**Figura 2-30. Curva de saturación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el NMN usando 0,063µg de enzima.** A) Izquierda: velocidad de síntesis de NAD en función de la concentración inicial de NMN de 0 a 7,5mM; sustrato en saturación ATP 7,5mM (experimento por duplicado). Derecha: Comparación con la curva control (ATP de 0 a 7,5mM; sustrato en saturación NMN 7,5mM). B) Tasa de cambio de la velocidad para las curvas del NMN y el ATP. Pendientes y coeficientes de correlación para regresiones lineales de grupos de puntos que representan distintas secciones de la curva. Izquierda: secciones de la curva para el NMN. Derecha: secciones de la curva control (ATP).



Teniendo en cuenta la curva de la figura 2-30 se realizaron los cálculos de las constantes cinéticas por distintos métodos de para la linealización de la curva del gráfico de *Michaelis*. Los métodos empleados para tales fines, se encuentran enlistados en la tabla 2-9.

**Tabla 2-9. Constantes cinéticas de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el NMN.** A continuación se presentan estimaciones del  $K_m$ , la Velocidad máxima, el  $K_{cat}$  y la eficiencia catalítica para enzima 6xHisTcNMNAT, con el sustrato NMN.

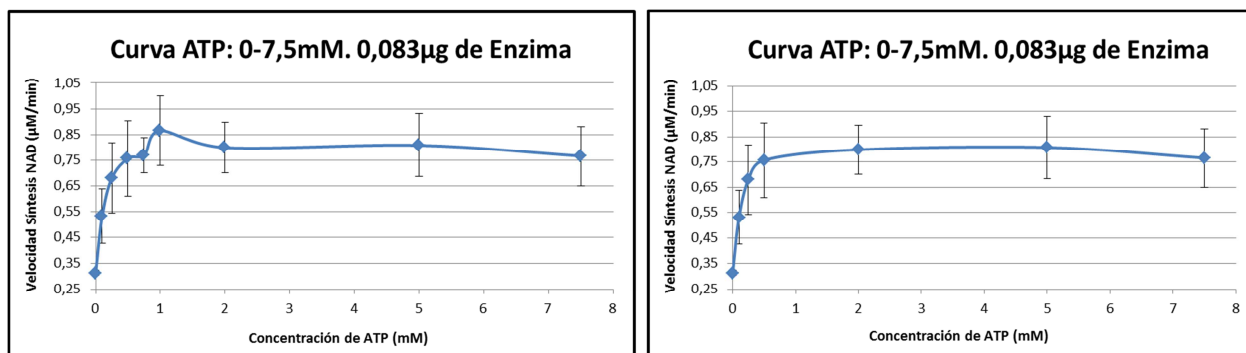
Método de determinación	$V_{max}$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	$K_m$ (mM)	$K_{cat}$	$K_{cat}/K_m$
Lineweaver–Burk	0,420	0,075	0,1795	2,39
Eadie–Hofstee	0,421	0,076	0,1797	2,35
Hanes–Woelf	0,429	0,101	0,1831	1,82

La curva del ATP de la figura 2-29, en el experimento donde se utilizaron 0,083 $\mu\text{g}$  de enzima, fue un experimento realizado por triplicado; con el cual se hizo el cálculo de las constantes cinéticas para este sustrato por distintos métodos de para la linearización como se muestra en la tabla 2-10. Para ello se retiraron ciertos puntos de la curva original a fin de amentar los coeficientes de correlación en aquellos métodos de linearización que empleaban regresión lineal. La curva original por triplicado y la versión modificada se muestran en la figura 2-31.

**Tabla 2-10. Constantes cinéticas de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el ATP.** A continuación se presentan estimaciones del  $K_m$ , la Velocidad máxima, el  $K_{cat}$  y la eficiencia catalítica para enzima 6xHisTcNMNAT, con el sustrato ATP.

Método de determinación	$V_{max}$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	$K_m$ (mM)	$K_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
Lineweaver–Burk	0,810	0,051	0,2606	5,07
Eadie–Hofstee	0,808	0,050	0,2600	5,18
Hanes–Woelf	0,811	0,033	0,2607	7,83

**Figura 2-31. Curva de saturación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT para el ATP utilizada en la determinación de constantes cinéticas.** Velocidad de síntesis de NAD en función de la concentración inicial de ATP de 0 a 7,5mM (sustrato en saturación NMN 7,5mM). *Izquierda:* curva original *Derecha:* curva modificada con menos puntos.



De las tablas 2-9 y 2-10 hay dos aspectos a resaltar. En primera instancia los valores para el  $K_m$  para el NMN son mayores que para el ATP. Si bien es cierto que el  $K_m$  depende de la cantidad de enzima empleada (por lo cual los valores de cada sustrato no son comparables), también es cierto que a menores cantidades de enzima este debe disminuir, dado que la velocidad es directamente proporcional a la cantidad de enzima (Copeland 2004); por lo cual en un principio los valores de  $K_m$  determinados para el NMN deberían ser menores que los del ATP ya que se utilizó menos enzima. El hecho de que aun así los  $K_m$  del NMN sean mayores que los del ATP es una muestra de la mayor afinidad que posee la 6xHisTcNMNAT por este último sustrato; un hecho que ha sido constatado a lo largo del proceso experimental para la determinación de las constantes. En segunda instancia es de notar que los valores de  $K_{cat}$  para ambos sustratos son distintos. Esto es importante dado que el  $K_{cat}$  es un parámetro independiente de la concentración de enzima y al ser la 6xHisTcNMNAT una enzima bi-sustrato, el número de recambio debería ser igual ya que por evento catalítico se deben usar ambos sustratos. No obstante el hecho de que los distintos valores de  $K_{cat}$  para ambos sustratos se parezcan, acercándose a  $0,20 \text{ s}^{-1}$ , muestra precisamente esa relación señalada para las enzimas bi-sustrato.

### **2.3 Generación *in sillico* del mutante amino terminal de la TcNMNAT.**

Tras haber confirmado la identidad de la TcNMNAT y caracterizar su actividad mediante una aproximación experimental, se buscó encontrar diferencias estructurales entre esta enzima y las NMNAT humanas. Al carecer de información experimental sobre la estructura secundaria o terciaria de la TcNMNAT, se partió de comparaciones entre la estructura primaria estas enzimas para encontrar secuencias divergentes entre las mismas.

Con este objetivo se realizó un alineamiento múltiple entre las secuencias de aminoácidos de la TcNMNAT y las secuencias que corresponden a las 3 isoenzimas humanas de la NMNAT (HsNMNAT-1, HsNMNAT-2 y HsNMNAT-3). De dicho alineamiento se identificó una inserción de 19 aminoácidos en el amino terminal de la estructura primaria de las TcNMNAT, que se encuentra ausente en la estructura primaria de las isoenzimas humanas (figura 2-32). Esta secuencia fue sometida, mediante tBLASTn y BLASTp, a la búsqueda en las bases de datos *TritypDB* (Aslett et al. 2010) y aquellas presentes en el NCBI (Geer et al. 2010).

**Figura 2-32. Alineamiento múltiple de secuencias de NMNAT humanas y de *T. cruzi*.**  
A) Secuencias utilizadas en el alineamiento múltiple; secuencias de *T. cruzi* (Azul), secuencias humanas (Naranja). B) Fragmento del alineamiento múltiple y secuencia ausente en isoenzimas humanas.

A.

Secuencias de alineamiento múltiple		
Gene ID	Organismo	Descripción
TCSYLVIO_008891	<i>T. cruzi</i> Sylvio X10/1	TcNMNAT
TcCLB.507047.170	<i>T. cruzi</i> CL Brener Esmeraldo-like	TcNMNAT
TcCLB.509179.80	<i>T. cruzi</i> CL Brener Non-Esmeraldo-like	TcNMNAT
Tc_MARK_7577	<i>T. cruzi</i> marinkellei strain B7	TcNMNAT
Q9HN9	Homo Sapiens	HsNMNAT-1
Q9BZQ4	Homo Sapiens	HsNMNAT-2
Q96T66	Homo Sapiens	HsNMNAT-3

B.



Secuencia ausente en isoenzimas humanas	
Secuencia de aminoácidos	Longitud
AASYRFSGLKLT PWSAIDV	19 Residuos

Respecto a la búsqueda realizada en *TritypDB* se encontraron los mismos candidatos presentes en la tabla 2-3. En el caso de las bases de datos del NCBI se encontraron dos proteínas hipotéticas obtenidas de ARN mensajeros parciales con números de acceso XM\_811350.1 y XM\_811291.1, ambos de la base de datos *Reference Sequence*. Para la secuencia XM\_811291.1 se observó una secuencia codificante con número de acceso XP\_816384.1; el número de acceso correspondiente a la secuencia del candidato 2 (tabla 2-1). La secuencia XM\_811350.1 posee un marco de lectura con el número de accesión XP\_816443.1. Esta secuencia se sometió a su vez a un tBLASTn en la base de datos *TritypDB* y como resultado se obtuvieron de nuevo los genes de la tabla 2-3. De hecho, el alineamiento con el marco de lectura TcCLB.509179.80 del genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener non-Esmeraldo-like, consta de un 100% de identidad. Estos resultados argumentan a favor de la idea de la secuencia divergente de la figura 2-32, es exclusiva de las NMNAT de *T. cruzi*.

Con el objetivo de averiguar sobre la posible importancia de esta secuencia en la función de la proteína putativa, se utilizaron las herramientas NetPhos 2.0 (Blom, Gammeltoft, and Brunak 1999), NetAcet 1.0 (Kiemer, Bendtsen, and Blom 2005) y GPS 2.1 (Xue et al. 2008) para detectar posibles motivos de modificación covalente en esta región en especial. El resultado de esta búsqueda se puede observar en la tabla 2-11.

**Tabla 2-11. Predicciones para sitios de modificaciones pos-traduccionales.**  
Programa de predicción, residuo y péptido o contexto de reconocimiento específico.

Predictor	Predicción	Residuo	Péptido
NetPhos 2.0	Fosforilación	Serina (S15)	LTPW <b>S</b> AIDV
GPS 2.1	Fosforilación	Serina (S15)	GLKLTPW <b>S</b> AIDV***
GPS 2.1	Fosforilación	Serina (S7)	*AASYRF <b>S</b> GLKLTPW
GPS 2.1	Fosforilación	Tirosina (Y4)	****AAS <b>Y</b> RFSGCLKL
GPS 2.1	Fosforilación	Serina (S3)	*****AAS <b>S</b> YRFSGCLK
GPS 2.1	Fosforilación	Threonina (T12)	RFSGCLKL <b>T</b> PWSAIDV
NetAcet 1.1	Acetilación	Serina	AAS <b>S</b> YRF

En dicha tabla se observa que este fragmento presenta aminoácidos que podrían ser sujetos de fosforilación y acetilación, lo cual permite proponer esta región como un sitio importante en la regulación de la proteína.

Partiendo de esta secuencia amino terminal única de las TcNMNAT se generó un mutante denominado  $\Delta$ NT-TcNMNAT. Este consta de una secuencia muy similar a la del candidato 2 de la TcNMNAT, pero con el fragmento amino terminal ausente de la misma. Este mutante se sometió a una evaluación *in silico* sus distintos niveles de estructura. Los análisis de estructura primaria muestran que este mutante posee, según las predicciones del programa *Protparam* (Gasteiger et al. 2005), una longitud de 270aa, una masa molecular de 29967.0Da y un punto isoeléctrico teórico de 5.73. la base de datos *Conserved Domain Database* del NCBI (Marchler-Bauer et al. 2013) detecta los mismos motivos de sitio activo y (T/H)XGH, que se detectaron inicialmente para la proteína nativa; al igual que con el dominio detectado con Pfam (Finn et al. 2006) de la tabla 2-4.

Esto muestra claramente que la delección del fragmento amino terminal no interrumpe ni afecta a ninguno posibles sitios involucrados en la actividad de la enzima. Por otra parte se modeló la estructura secundaria de la  $\Delta$ NT-TcNMNAT mediante los algoritmos GORIV, PDH y PREDATOR del servidor NPS@ (Network Protein Sequence Analysis) (Combet et al. 2000). Los porcentajes de distintos patrones de estructura secundaria tanto del mutante como los previamente calculados para la TcNMNAT se encuentran en la tabla 2-12.



**Tabla 2-12. Comparación entre patrones de estructura secundaria de la TcNMNAT y el mutante deletional  $\Delta$ NT-TcNMNAT.** Porcentajes de residuos predichos como hélices alfa, láminas beta o regiones aleatorias mediante los algoritmos GORIV, PDH y PREDATOR. Promedio de porcentajes para patrones de estructura secundaria.

Herramienta bioinformática	TcNMNAT			$\Delta$ NT-TcNMNAT		
	Hélice- $\alpha$ (%)	Lámina- $\beta$ (%)	Random Coil (%)	Hélice- $\alpha$ (%)	Lámina- $\beta$ (%)	Random Coil (%)
GOR4	44.98	11.76	43.25	42.22	15.56	42.22
PHD	38.41	16.26	45.33	35.19	18.15	46.67
PREDATOR	45.33	9.69	44.98	45.56	10.37	44.07
PROMEDIO	42,91	12,57	44,52	40,99	14,69	44,32

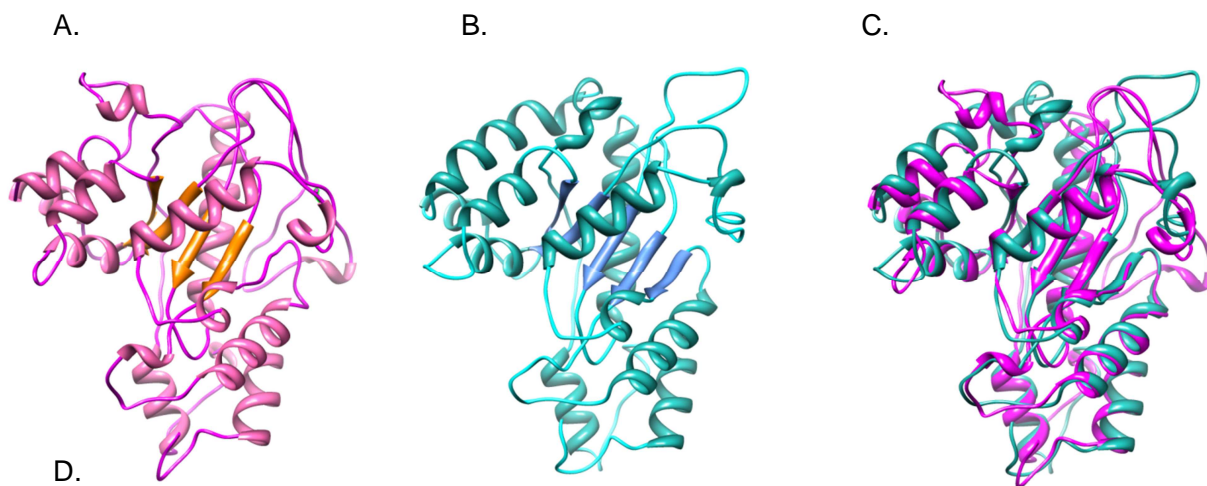
En los promedios para los porcentajes de hélices  $\alpha$  y Hojas  $\beta$  se observa que el mutante posee más Hojas  $\beta$  que la proteína silvestre, y menos hélices  $\alpha$  que esta. Tal variación oscila alrededor de un 2% para ambas enzimas.

El mejor modelo de la estructura terciaria del mutante  $\Delta$ NT-TcNMNAT, tras someterlo al servidor I-TASSER consta de un C-score de -0.25, un RMSD de 6.5 Angstrom y un TM-score de 0.68 (figura 2-33). De igual forma los términos de ontología genética (*GO terms*) predichos por este servidor son los mismos predichos para la TcNMNAT silvestre. Por otra parte se realizó un alineamiento estructural entre el modelo generado para la  $\Delta$ NT-TcNMNAT y aquel de la TcNMNAT, mediante las herramientas *Matchmaker* del programa *UCSF Chimera v1.8* (Pettersen et al. 2004) y el servidor DALI (Holm and Rosenström 2010); tal y como se muestra en los apartados C y D de la figura 2-33.

De acuerdo con los valores de RMSD es evidente que el fragmento deletcionado no afecta drásticamente la estructura de la proteína. Igualmente no se observan cambios drásticos en la disposición tridimensional del motivo estructural de unión a nucleótidos  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  (plegamiento Rossmann). Sin embargo cabe notar que el alineamiento estructural

muestra claras diferencias en la estructura secundaria propia de los modelos generados Que igualmente son observables en la superposición de los modelos.

**Figura 2-33. Modelos y Alineamientos estructurales entre la proteína putativa TcNMNAT y su respectivo mutante deletional  $\Delta$ NT-TcNMNAT.** A) Modelo TcNMNAT. B) Modelo  $\Delta$ NT-TcNMNAT. C) Superposición de modelos visualizado por *USCF Chimera*:  $\Delta$ NT-TcNMNAT (azul), TcNMNAT (magenta). D) Valores para distintos parámetros de calidad en ambos modelos y valores de RMSD según las herramientas utilizadas para el alineamiento estructural.



Parámetros de calidad para los modelos realizados.		
Modelo	TcNMNAT	$\Delta$ NT-TcNMNAT
Herramienta	I-TASSER	I-TASSER
C-score	-5 < -0.78 < 2	-5 < -0.25 < 2
TM-score	0 < 0.61 $\pm$ 0.14 < 1	0 < 0.68 $\pm$ 0.12 < 1
RMSD	7.8 $\pm$ 4.4Å	6.5 $\pm$ 3.9Å
Valores para el alineamiento estructural		
Herramienta	No. pares de átomos.	RMSD
<i>Matchmaker</i>	182	1,009
DALI <i>pairwise</i>	245	2,1

## 3. Discusión de resultados.

### 3.1 De la aproximación bioinformática.

Para la identificación de la NMNAT de *Trypanosoma cruzi*, se partió de dos candidatos cuyas secuencias se encontraban anotadas como enzimas NMNAT putativas de este parásito; tal y como se muestra en la tabla 2-1. Las respectivas secuencias aminoácidos y nucleótidos de tales candidatos son muy similares entre sí, pues constan de una identidad que oscila alrededor del 98% (tabla 2-2). Tal nivel de identidad permite pensar que ambos candidatos constituyen variantes polimórficas de un mismo gen, y en consecuencia son un mismo marco de lectura. El polimorfismo genético un concepto de carácter poblacional, en donde no solo se requiere de la ocurrencia de dos o más alelos sino que además se necesita que tales variantes posean una frecuencia apreciable dentro de una población (Cavalli-Sforza and Bodmer 1999). Dada esta circunstancia, otorgar el estatus de polimorfismo a los candidatos encontrados va más allá de los alcances del presente estudio; sin embargo se puede asegurar que, de expresarse, las proteínas codificadas por estos genes candidatos deberían ejecutar una misma función celular, dada su similitud estructural.

Ya contando con un posible candidato, se inició una búsqueda por tBASTn para comprobar la existencia de genes cuyo marco de lectura codificase para una secuencia de aminoácidos que pudiese identificarse con la proteína putativa del candidato. Como resultado se encontraron 4 registros de genes anotados como posibles NMNAT para los genomas disponibles en la base de datos TritrypDB de distintas cepas de *T. cruzi*, como se puede observar en la tabla 2-3. Es de notar la relevancia de dicho resultado: pues la presencia de un gen identificable con el candidato, en cuatro genomas de tres cepas distintas de la especie parásita, sumado al hecho de que tales genes han sido anotados

previamente como posibles NMNAT según los términos de ontología genética, argumenta a favor identidad del candidato como una enzima de la familia de las NMNAT propia de este tripanosomátido. De igual forma la presencia de un alineamiento con 100% de identidad entre la secuencia del genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener Esmeraldo-like (marco de lectura TcCLB.507047.170) y el candidato en cuestión, muestra que tal secuencia de por sí está presente en uno de los genomas disponibles de *T. cruzi*, en la mencionada base de datos.

Tras haber corroborado la presencia del candidato a NMNAT en el genoma de *T. cruzi*, se realizó un análisis estructural *in silico* del mismo para así establecer comparativos estructurales de la proteína putativa, con otras NMNAT.

La estructura primaria del candidato al parecer consta de motivos propios de la familia de las NMNAT. Las búsquedas en bases de datos de dominios detectaron sub-secuencias relacionadas con la función nucleotidil-transferasa propia de esta familia de enzimas, las cuales se muestran en la tabla 2-4 de la sección de resultados. De acuerdo con la literatura tales motivos enmarcan características distintivas y elementos indispensables en la función de las NMNAT. El motivo catalogado como “posible sitio activo” de acuerdo con la *Conserved Domain Database*, consta de la secuencia “ACGSFNPITNMHLRMFE” la cual se correlaciona con el motivo de reconocimiento de ATP “GXXXPX(T/H)XXH”. Esta secuencia junto con el motivo “SXTXXR”, han sido propuestos como una firma universal característica de todas las NMNAT (Garavaglia et al. 2002). Por otro lado, el motivo (T/H)XGH también detectado por con la base de datos *Conserved Domain Database*, es un motivo propio de todas las nucleotidil-transferasas implicado en el reconocimiento y unión del ATP (D’Angelo et al. 2000; Saridakis et al. 2001). Este motivo es muy conservado y desempeña un papel en el proceso de catálisis que ha sido confirmado por aproximaciones mutagénicas, enzimáticas y cristalográficas. Tan importante y conservada es su función, que la posición que este motivo ocupa dentro de la secuencia de aminoácidos se considera como un factor determinante a la hora de establecer si en el mecanismo de reacción existe un complejo ternario ordenado o aleatorio (Saridakis et al. 2001).

De acuerdo con la clasificación de dominio arrojada por la base de datos *Pfam*, el dominio de citidil-transferasa encontrado, se clasifica como parte de la clase HUP. Esta clase comprende entre otras proteínas, nucleotidil-transferasas con el motivo HIGH (Aravind,

Anantharaman, and Koonin 2002; Edgar 2004; Wolf et al. 1999). Esto es un argumento a favor de la pertenencia del candidato a la familia de las NMNAT.

Como resultado de la comparación entre las estructuras primarias del candidato a NMNAT con otras NMNAT humanas, se identificó una inserción de 19 aminoácidos en el amino terminal de la TcNMNAT, ausente en las isoenzimas humanas (figura 2-32). Las búsquedas por tBLASTn y BLASTp en distintas bases de datos muestran que dicha secuencia es exclusiva de las NMNAT putativas de las distintas cepas de *T. cruzi*. La detección de residuos y motivos de reconocimiento para posibles modificaciones post-traduccionales por distintos servidores (tabla 2-11) hace de esta secuencia de sumo interés; ya que ello sugiere que la secuencia puede intervenir en el funcionamiento de la enzima e incluso regular su actividad. Esto abre la posibilidad de explorar a futuro esta peculiaridad de la TcNMNAT, a fin de explotar su potencial como un posible blanco farmacológico, o como posible herramienta de diagnóstico.

El modelo de la estructura terciaria generado a partir del servidor I-TASSER consta de parámetros aceptables con respecto a los valores de C-Score, TM-Score y RMSD hipotético (figura 2-1). El C-score se define con base en la calidad de las alineaciones de *Threading*, la convergencia de las simulaciones de refinamiento y ensamblaje estructural del servidor. El RMSD teórico es la media de los RMSD entre los señuelos y el centroide del clúster; lo que da un indicio de la similitud que existiría entre el modelo simulado y su contraparte experimental, en caso de que existiese (Roy, Kucukural, and Zhang 2010; Y. Zhang 2008). Por otra parte TM-Score también es una medida para dilucidar la similitud entre dos pares de estructuras, siendo entre más alto el puntaje, mejor el acople entre ambos modelos estructurales. No obstante, este parámetro a diferencia del RMSD no depende del tamaño de la proteína, proporcionando una medición más local en cuanto a las diferencias topológicas entre modelos (Y. Zhang 2008). En el caso del modelo generado en la figura 2-1 el C-score tiende más hacia la cota superior del rango que abarca este parámetro ( $-5 < -0.78 < 2$ ) y de igual manera lo hace el TM-score ( $0 < 0.61 \pm 0.14 < 1$ ). Si bien el RMSD hipotético calculado es bastante grande, también lo es su error asociado ( $7.8 \pm 4.4 \text{ \AA}$ ). Es posible que la presencia de la sub-secuencia exclusiva de la TcNMNAT mencionada en el apartado anterior (figura 2-32) contribuya a aumentar el RMSD hipotético de este modelo. Pues de ser una secuencia exclusiva de un grupo de

enzimas cuya estructura terciaria aún no se ha dilucidado, ha de ser muy difícil asignarle un pliegue-plantilla adecuado por este método de simulación.

EL modelo tridimensional generado para el candidato a TcNMNAT es acorde a las predicciones de estructura secundaria generadas por algoritmos *PDH*, *GORIV* y *PREDATOR* (tabla 2-5). En ambas predicciones se destaca la presencia de elementos típicos de un plegamiento de *Rossmann* (motivo  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ ); una estructura super-secundaria considerada como “un pliegue clásico” para la unión de nucleótidos (Han et al. 2006; Olland et al. 2002). Además, Las predicciones de homólogos y análogos estructurales más próximos a partir de las herramientas *COFACTOR* y *TM-align* (tablas 2-6 y 2-7) muestran en su gran mayoría proteínas pertenecientes a la súper-familia de las nucleotidil-transferasas o a la familia de las NMNAT. En consecuencia, la simulación de la estructura terciaria de este candidato, exhibe características estructurales que lo identifican como una NMNAT.

Los alineamientos estructurales entre el modelo tridimensional de la TcNMNAT y NMNAT humana de código PDB: 1NUU (X. Zhang et al. 2003) (figura 2-2), muestran una alta similitud estructural entre ambos de modelos de acuerdo con los valores de RMSD. Esto es un argumento más a favor de la posible función NMNAT del candidato. Sin embargo este resultado contrasta con el hecho de que ambas secuencias constan de una identidad inferior al 30%. Aquella región de la secuencia de aminoácidos idéntica entre ambas proteínas debe estar relacionada con el centro activo de estas; pues La poca identidad entre enzimas NMNAT define la conservación de aspectos estructurales vinculados al funcionamiento de las mismas (Bi, Wang, and Xie 2011).

La aproximación bioinformática realizada para la identificación de una NMNAT de *Trypanosoma cruzi*, proveyó al presente estudio de numerosos y valiosos argumentos a favor de la identidad y funcionalidad de los candidatos seleccionados. Estos análisis abarcaron aspectos varios; desde la presencia de los candidatos los genomas de la especie del parásito, hasta las características de los distintos niveles de su estructura. En consecuencia, tales predicciones fueron cruciales a la hora de proceder con las etapas experimentales posteriores. Ya que la secuencia de dichos candidatos fue la base para el diseño de cebadores y la subsecuente clonación, expresión y caracterización de la proteína recombinante correspondiente.

Por otra parte Esta aproximación bioinformática permitió establecer comparativos con las isoenzimas humanas, gracias a la detección de una secuencia exclusiva de la NMNAT de *Trypanosoma cruzi*. Esta peculiaridad llevo a proponer un mutante de la TcNMNAT carente de esta sub-secuencia cercana al extremo amino terminal ( $\Delta$ NT-TcNMNAT) (figura 2-33). Los análisis bioinformáticos estructurales muestran que en los distintos niveles de su estructura existe una gran similitud con la versión silvestre de esta enzima; a pesar de las pequeñas diferencias que se observaron en cuanto a los patrones de estructura secundaria (tabla 2-12). Ello sugiere que este mutante podría también ser funcional. La futura evaluación experimental de este mutante, mediante su clonación, expresión y caracterización enzimática, permitirá conocer más profundamente el funcionamiento y la posible regulación de la TcNMNAT.

### 3.2 De la clonación de la *Tcnmnat*.

Inicialmente, la amplificación de la secuencia codificante para la TcNMNAT, se llevó a cabo por medio de la técnica de *Long PCR* (figura 2-3). Dicha amplificación se realizó partiendo de ADN genómico extraído de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa *CL Brener*), teniendo en cuenta que en los tripanosomátidos prácticamente todos los genes que codifican para proteínas carecen de intrones; con muy contadas excepciones (Gomez et al. 2010; Vanhamme and Pays 1995). Posteriormente se acopló dicha amplificando por *Long PCR* a una segunda amplificación por medio de la *Pfu* polimerasa (figura 2-3); y así obtener la secuencia-inserto para la ligación al vector pET100 D-TOPO.

El *Long PCR* es una variante que hace uso de dos tipos de polimerasas; una de alta procesividad (*Taq* polimerasa) y otra con capacidad de corrección (*Pfu* polimerasa). Si bien se podría pensar que con solo una polimerasa de alta procesividad es suficiente, los nucleótidos mal incorporados reducen la eficiencia de polimerasas altamente procesivas, pues inducen la terminación prematura de la síntesis de la hebra. Sin embargo la adición en pequeñas cantidades de polimerasas con actividad 3'-5'-exonucleasa, permite que la polimerasa predominante complete dicha síntesis (Cheng et al. 1994). Además se ha observado que las tasas de error en la replicación, para mezclas de polimerasas como

*Taq/Pfu* o Klen-taq/Pfu son menores en comparación con las tasas que presenta la *Taq* polimerasa pura (Cline, Braman, and Hogrefe 1996).

El *Long PCR* es una técnica normalmente se usa para amplificar fragmentos gran tamaño (10kb). No obstante también es propicio para amplificar fielmente genes de una sola copia inmersos en genomas complejos (Cheng et al. 1994). Existen razones para suponer que el ADN genómico de *T. cruzi* consta de regiones de alta complejidad. Pues la estructura del genoma de este tripanosomátido tiene una serie de particularidades que se desvían del contexto genómico “estándar”, desde el cual se amplificaría una secuencia en otros modelos eucariontes. De estas peculiaridades se destacan:

- *La alta heterogeneidad genética de estos parásitos.* esto se debe a un cariotipo pobremente definido, pues existe una gran variación de tamaño que se presenta entre cromosomas homólogos y entre cromosomas de distintas cepas (Souza et al. 2011).
- *Genes proteino-codificantes empacados en Clusters.* Constan repeticiones en tándem de marcos de lectura idénticos (o muy similares) y regiones espaciadoras de secuencia no relacionada. Se transcriben como policistrones separados por pequeñas secuencias intergénicas (Vanhamme and Pays 1995).
- *Pocos promotores identificados en el parásito.* Ninguno de estos es un promotor para la ARN polimerasa II. Esto ha llevado a especular que la polimerasa II inicia la transcripción en secuencias divergentes a las de un promotor eucarionte tradicional (Gomez et al. 2010).

Teniendo en cuenta lo anterior es justificable considerar el ADN genómico de *Trypanosoma cruzi* como una plantilla compleja para la amplificación por PCR. Además, apreciando el hecho de que el fragmento a amplificar se asumía como un marco de lectura de copia única o de muy pocas copias en dicho genoma, la estrategia de *Long PCR* se perfiló como la mejor opción en aras de obtener un amplificado abundante y fiel a la respectiva secuencia de la plantilla.

En la re-amplificación del fragmento y la subsecuente obtención de la secuencia-inserto para el proceso de ligación (figura 2-4), se utilizó la *Pfu* polimerasa. Este segundo paso se llevó a cabo, al tener en cuenta ciertos aspectos relacionados con la ligación de dicho inserto al vector de expresión pET100 D-TOPO. Los amplificados de la *Taq* polimerasa



(la enzima predominante en el *Long PCR*), constan de asideros 3', causados por la incorporación intrínseca de adeninas en estos extremos del fragmento (Marchuk et al. 1991). Estos asideros hacen imposible ligar el fragmento al vector pET100 D-TOPO; pues este carece de asideros con timinas complementarias en sus extremos. Ello requiere fragmento posea extremos romos para dar lugar a la ligación.

Por otra parte la *Pfu* polimerasa amplifica fragmentos romos con alta fidelidad (Cline, Braman, and Hogrefe 1996) pero es poco procesiva. Entonces, al realizar una segunda PCR con la *Pfu* polimerasa, se obtienen copias con extremos romos, y se aumenta la eficiencia de la reacción dada la abundancia y el carácter repetitivo de la plantilla.

Habiendo obtenido una secuencia-inserto adecuada, se procedió con la ligación al vector de expresión pET100 D-TOPO, y subsecuentemente se llevó a cabo el proceso de clonación del plásmido recombinante pET100/Tcnmnat, mediante la transformación del producto de ligación en la cepa de mantenimiento *E. coli* TOP10 (figura 2-5).

El vector pET100 D-TOPO es un plásmido de carácter direccional y puede ligarse directamente con productos de PCR, por lo que no es necesario recurrir a la sub-clonación; lo que claramente facilita la construcción de un vector de expresión funcional. Además este vector posee ciertas propiedades, que facilitan la ligación y la posterior expresión, detección y purificación de la proteína recombinante expresada. El pET100 D-TOPO adiciona una marca de seis histidinas "6xHis" al extremo amino-terminal de la proteína recombinante expresada. Tal marcaje permite llevar a cabo su inmuno-detección y purificación, mediante el uso de anticuerpos específicos de uso comercial o resinas acopladas a iones metálicos respectivamente. Además el sistema de expresión este vector utiliza el promotor bacteriófago fuerte T7, el cual ha sido modificado para contener una secuencia del operador *lac*. Esto permite que la expresión de la proteína recombinante sea abundante (dada la naturaleza del promotor) y al mismo tiempo inducible; pudiendo ser controlada por análogos de la alolactosa, como el IPTG (Life Technologies 2010). Además, el pET100 D-TOPO cuenta con un sistema de ligación direccional asistido por topoisomerasas (Life Technologies 2010), lo cual facilita en gran medida la ligación, al poder prescindir de ligasas. Esto cobra importancia al tener en cuenta que el uso de ligasa es considerado como un factor que disminuye la eficiencia de transformación cuando se utilizan productos de ligación. Si bien esta desventaja puede superarse por medio de la dilución, diálisis o la precipitación de la reacción de ligación, ninguna de estas soluciones ha sido totalmente satisfactoria; pues no son

particularmente eficaces, consumen mucho tiempo o pueden resultar en la pérdida de preciado ADN complementario (Ymer 1991).

Dado que se buscaba de obtener un vector recombinante de fácil de transformar y una proteína recombinante de fácil detección y purificación, las ventajas mencionadas, se consideraron razones suficientes para escoger al pET100 D-TOPO como vector de clonación y expresión para la secuencia codificante para la TcNMNAT.

La reacción de ligación entre el inserto en cuestión y el pET100 D-TOPO se realizó de manera directa, sin purificar la banda de interés a partir de un gel agarosa. Por lo que la muestra utilizada en la reacción de ligación constaba del mismo perfil electroforético observado en la figura 2-4.

Normalmente el amplificado a ligar es separado primero por electroforesis horizontal, y posteriormente se escinde la banda del gel de agarosa; tras lo cual se eluye el ADN del gel y dicho eluido es utilizado en la reacción de ligación. Sin embargo esta técnica presenta riesgos, pues la posible presencia de impurezas provenientes de la agarosa junto con la irradiación de la muestra con el UV proveniente de un trans-iluminador, comprometen la calidad y eficiencia del inserto en lo que concierne a su ligación y la transformación del respectivo vector recombinante (Gründemann and Schömig 1996). En el caso de la radiación UV, se sabe que periodos de exposición de 20 a 45 segundos (lo que normalmente tarda la escisión de la banda) generan daño extensivo del ADN embebido en la agarosa. De acuerdo con análisis de ligación y transformación, dicho daño al ADN es superior al 99% de la muestra (Gründemann and Schömig 1996). Por lo tanto el realizar la ligación de manera directa protege la integridad del inserto y garantiza una mejor transformación con el vector resultante.

Una posible desventaja de la ligación directa, tiene que ver con la pureza de la muestra a ser empleada en la reacción. Ya que si el producto de ligación constase de vectores con distintos insertos, el proceso de transformación posterior podría dar lugar a transformantes con más de un tipo de plásmido o a una menor proporción de transformantes con el inserto de importancia. Si se observa el perfil electroforético del amplificado utilizado en la reacción (figura 2-1), muestra un par de bandas de alto peso molecular, superior a los 1000pb. Lo cual sugiere en un principio que esta muestra no es apta para una ligación directa. No obstante es necesario considerar el efecto del tamaño del plásmido en la eficiencia de la transformación; pues esta declina con el aumento del

tamaño del plásmido (Hanahan and Harbor 1983). Ello permite inferir que los plásmidos ligados al inserto de 870pb serán transformados con mayor probabilidad que aquellos ligados a fragmentos de mayor tamaño; dado que estos últimos darán lugar a plásmidos más grandes. Por lo que sí es posible utilizar amplificadores con impurezas distintas a la banda de interés siempre y cuando tales impurezas tengan un tamaño mucho mayor al de la banda en cuestión.

La figura 2-5 muestra la transformación de células competentes TOP10 con el producto de ligación pET100/Tc<sup>r</sup>mnat. En esta figura se observan 32 colonias de transformantes, producto de un proceso con una eficiencia de 2,975 UFC/ng de ADN. En ciertos estudios se reporta que para células químicamente competentes cosechadas a una OD<sub>600</sub> entre 0.3-0.4, la eficiencia de transformación por choque térmico se ubica alrededor de los 4x10<sup>7</sup> UFC/pg de ADN (Tang et al. 1994). Por lo cual la eficiencia de transformación reportada en este estudio se encuentra muy por debajo del estándar. Sin embargo hay que tener en cuenta que normalmente, para determinar eficiencias de transformación suelen utilizarse plásmidos previamente clonados y purificados (Hanahan and Harbor 1983; Tang et al. 1994; Ymer 1991); más no mezclas de ligación. De hecho se considera que el uso dichas mezclas, en ciertas técnicas de transformación, dan lugar a valores de eficiencia muy inferiores en comparación con eventos de transformación donde se utilizan plásmidos clonados o purificados (Ymer 1991). Es de resaltar que aunque hubo una muy baja eficiencia de transformación, la proporción de transformantes que mostraron poseer el vector recombinante pET100/Tc<sup>r</sup>mnat fue relativamente alta (59% de la muestra). Tal y como lo muestran los análisis de rastreo por PCR de colonia (figura 2-6).

De los clones positivos para el vector pET100/Tc<sup>r</sup>mnat (figura 2-6) se seleccionaron 4 clones en particular, numerados como clones 3, 5, 16 y 19, a los cuales se les extrajo su ADN plasmídico y se confirmó la identidad del plásmido recombinante por PCR y ensayos de restricción; tal y como se observa en las figuras 2-7 y 2-8. Es de notar en estas dos figuras el comportamiento del clon número 5: que por un lado en la figura 2-7 amplifica el fragmento de ~870pb (lo que indica la presencia del inserto en cuestión, en el ADN plasmídico de este), pero por otra parte en la figura 2-8 este clon presenta un perfil electroforético con bandas propias del vector recombinante y bandas congruentes con la simulación para el vector vacío. Este comportamiento es interesante, pues estos resultados en conjunto muestran que el clon 5 posee dos tipos de ADN plasmídico: un tipo corresponde al vector pET100/Tc<sup>r</sup>mnat y el otro se corresponde con el vector sin el

inserto. El vector pET100 D-TOPO, consta de extremos asimétricos (un extremo romo y un extremo con asidero en el 5' de la hebra complementaria) asociados a topoisomerasas por intermediarios fosfo-tirosina. Dada la asimetría de los extremos el vector por sí solo no puede ciclarse; es más, necesita de un inserto con una secuencia específica en el extremo 5' de la hebra *Watson* (5'-CACC-3') para desplazar el asidero 5' de uno de los extremos, y así permitir que la topoisomerasa transfiera el enlace entre el fosfato y la tirosina, al correspondiente del anillo de la ribosa para dar lugar a un enlace fosfodiéster, y ciclar el vector recombinante (Life Technologies 2010). Por lo tanto el segundo tipo de ADN plasmídico presente en el clon 5, debe corresponder a un vector recombinante pET100 D-TOPO con un inserto de poco tamaño. Dicho inserto debió encontrarse en muy baja cantidad, dado que no pudo observarse en el amplificado de la reacción de ligación de la figura 2-4; no obstante y teniendo en cuenta que la eficiencia de transformación declina con el tamaño del plásmido (Hanahan and Harbor 1983), el vector con el inserto de poco tamaño pudo ser transformado con mucha más facilidad que el vector con el inserto codificante para la TcNMNAT, de ahí que ocurriese un evento de co-transformación en el clon número cinco.

Este episodio señala la importancia de utilizar más de una aproximación, a la hora de confirmar la identidad de plásmidos recombinantes. De igual forma resalta la relevancia de los ensayos de digestión con enzimas de restricción en la identificación de tales vectores. Pues la posibilidad de eventos de co-transformación como el observado para el clon 5, sin la identificación adecuada de su ocurrencia, pueden comprometer etapas experimentales posteriores en las que se utilice tal ADN plasmídico; como es en este caso, la obtención de células transformantes en cepas de expresión y la subsecuente expresión de proteína recombinante.

### 3.3 De la expresión de la 6xHisTcNMNAT.

En la figura 2-9 se puede observar la expresión de una proteína recombinante, producto de la inducción de cultivos de células *E. coli* BL21 (DE3). Dicha proteína posee el tamaño esperado para la secuencia de aminoácidos de la TcNMNAT, junto con la marca de histidinas fusionada (35kDa); de acuerdo con el SDS-PAGE. Además Esta misma banda es detectable por ensayos de *Western blot*, lo que evidencia la presencia de la marca de histidinas, en la proteína correspondiente. Todo esto sugiere que la proteína recombinante expresada corresponde al candidato de la NMNAT de *Trypanosoma cruzi*, objeto del presente estudio; la 6xHisTcNMNAT.

Por otra parte se evaluó la expresión de la proteína recombinante por SDS-PAGE y *Western blot*, en las fracciones de proteína soluble e insoluble; con el fin de determinar la distribución de la proteína recombinante en dichas fracciones y así estandarizar condiciones que optimicen la síntesis de la 6xHisTcNMNAT soluble (figura 2-10). En esta figura se observa una presencia significativa de 6xHisTcNMNAT para todos los tiempos de inducción en la fracción soluble; a pesar de observar también que la mayoría de esta proteína se encuentra en la fracción insoluble para todos los tiempos de inducción. La proteína insoluble se encuentra como cuerpos de inclusión, los cuales a su vez se constituyen por proteína poco o mal plegada (Dragosits, Nicklas, and Tagkopoulos 2012; Sørensen and Mortensen 2005). Contrariamente, la proteína recombinante soluble se asume como proteína nativa y por ende funcional. En lo que concierne al presente estudio, la presencia de proteína soluble es beneficiosa, dado que esto permite someterla a ensayos enzimáticos para corroborar su identidad. Por otra parte la proteína insoluble necesita un procesamiento posterior que abarca su extracción y re-naturalización a partir de cuerpos de inclusión (Dragosits, Nicklas, and Tagkopoulos 2012). Dicho proceso es considerado como indeseable; siendo sus principales obstáculos: la pobre tasa de recuperación de proteína, la necesidad de optimizar condiciones de re-naturalización exclusivas para la proteína a purificar y la posibilidad de que los procedimientos de extracción afecten la integridad de las proteínas re-plegadas (Sørensen and Mortensen 2005). Aún si se optara por extraer los agregados de proteína recombinante de los cuerpos de inclusión, la re-naturalización se perfila como un paso

problemático a la hora de establecer que tanto de la proteína ha recobrado su estado nativo. Esto a su vez presentaría un obstáculo en la verificación y caracterización de actividad enzimática de la proteína en cuestión. Tomando en consideración lo anterior, la presencia de proteína soluble en cantidades significativas es un logro importante, pues al tratarse de proteína nativa es posible purificarla y directamente someterla a ensayos de actividad; sin embargo el hecho de que la mayoría de la proteína recombinante expresada se encontrase como cuerpos de inclusión, sugiere realizar modificaciones que optimicen el proceso con el objetivo de aumentar la producción de proteína soluble.

Para optimizar la expresión de proteína soluble existen dos tipos de métodos: aquellos en los que se modifican las condiciones de expresión y aquellos en los que se rediseña la estructura regulatoria del vector (Sørensen and Mortensen 2005). En el presente estudio se llevaron a cabo modificaciones de las condiciones de expresión, que no llevaron a cambios apreciables en cuanto a la solubilidad de la proteína recombinante expresada. Reducir la concentración de inductor, inducir en una fase logarítmica tardía y utilizar bajas temperaturas de inducción, son estrategias que incrementan la solubilidad de la proteína expresada (San-Miguel, Pérez-Bermúdez, and Gavidia 2013; Sørensen and Mortensen 2005). Esto se debe a que la “carga metabólica” que se genera en la célula por la expresión de un gen heterólogo (pues materiales y energía son sustraídos de las rutas metabólicas regulares, para el mantenimiento dicha expresión) es un factor influenciado por condiciones ambientales. Considerando que dicha carga determina la tasa de síntesis de proteína recombinante, es posible controlar la tasa expresión del gen heterólogo mediante la modificación de dichas condiciones y así disminuir la formación de cuerpos de inclusión; causada por la acumulación de proteína desnaturalizada (Sørensen and Mortensen 2005). Por lo tanto, son claras las razones por las cuales se decidió alterar las condiciones de expresión de la 6xHisTcNMNAT. A pesar de no haber obtenido una mejora evidente, al menos dichos cambios facilitaron la ejecución del experimento y permitieron economizar materiales de trabajo.

Tras no observar cambios en la expresión de proteína recombinante bajo distintas condiciones, se optó por expresar la 6xHisTcNMNAT en la cepa alternativa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (figura 2-11). De igual forma se co-expresó la proteína recombinante con chaperonas (figura 2-12).

La cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL es una cepa diseñada para superar problemas en la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, relacionados con el sesgo codónico. Este fenómeno que se presenta cuando el uso codónico del sistema de expresión de la proteína foránea difiere de aquel del sistema de expresión heterólogo; lo cual lleva a la existencia de codones raros, cuyos respectivos ARN de transferencia son de baja expresión y esto conduce a una pobre expresión de la proteína recombinante (Rosano and Ceccarelli 2009). El enriquecimiento en número de copias de genes que codifican para los ARN de transferencia de estos codones raros, es una característica que confiere a la cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL ventajas en la expresión de ciertas proteína recombinante donde otras cepas no pueden (Rosano and Ceccarelli 2009). Sin embargo, teniendo en cuenta la formación de cuerpos de inclusión es un fenómeno influenciado por el pobre plegamiento de proteína (Dragosits, Nicklas, and Tagkopoulos 2012; Sørensen and Mortensen 2005), la cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL al ser más eficiente en la producción de ciertas proteínas recombinantes puede ser más proclive a tener problemas de solubilidad; ya que la tasa de síntesis de la proteína puede superar la velocidad de plegamiento de la misma haciendo a estas moléculas propensas a la agregación (Rosano and Ceccarelli 2009). De hecho, para aquellas proteínas con un porcentaje superior al 5% de aminoácidos codificados por codones-RIL, el sistema de expresión constituido por la cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL se caracteriza por generar una mayor proporción de cuerpos de inclusión además de crecimiento retardado una baja producción de células por cultivo (Rosano and Ceccarelli 2009). Quizá este problema explique porque la cepa BL21 (DE3) genera una mayor cantidad de proteína recombinante en la fracción insoluble, a pesar de que para la proteína soluble, ambas cepas generan la misma cantidad. En todo caso el uso de esta cepa de *E. coli* como cepa alternativa de expresión no fue el más adecuado, ya que en teoría incrementa el efecto adverso que se buscaba controlar desde un principio.

En el caso de la co-expresión de la 6xHisTcNMNAT con chaperonas (figura 2-12) se buscó co-transformar el sistema de expresión de tal forma que expresase la chaperona *Trigger factor* concomitantemente con la proteína recombinante en cuestión.

El *Trigger factor* de *Escherichia coli* es una prolil-isomerasa, que intercambiando las conformaciones de los residuos de prolina, acelera el paso límite en el plegamiento de proteínas con una eficacia muy alta. Esta proteína suele asociarse con las cadenas de polipéptido naciente en el ribosoma, de esta manera se piensa que cataliza el

plegamiento de proteínas recién sintetizadas (Hesterkamp et al. 1996; Scholz et al. 1997). De hecho estudios de cristalografía de rayos x de esta chaperona en complejo con la subunidad ribosómica grande *Haloarcula marismortui*, muestran que el dominio de unión al ribosoma se proyecta sobre la salida del túnel ribosomal creando un espacio o “cuna” donde los péptidos nacientes pueden ser protegidos de la acción de proteasas y su agregación (Ferbitz et al. 2004). En consecuencia, el empleo de esta estrategia de co-expresión mostraba resultados prometedores; sin embargo los correspondientes resultados no muestran una mejora evidente. Las diferencias notorias en la cantidad de proteína cargada en los pozos del SDS-PAGE de la figura 2-12 (dada la viscosidad de la muestra), comprometen posiblemente los resultados de este experimento. Empero cabe tener en cuenta que, a pesar de que la sobreexpresión del *Trigger factor* mejora notablemente la solubilidad de ciertas proteínas, al aumento de la solubilidad es mejorado por la expresión conjunta del con otras chaperonas como GroEL-GroES, pues al parecer estas tres proteínas desempeñan papeles sinérgicos *in vivo* (Nishihara et al. 2000) Por lo tanto se recomienda para futuras mejoras de la expresión mediante este tipo de estrategias, realizar la co-transformación con vectores que expresen esta tripleta de chaperonas, a fin de contar con un sistema más completo para el plegamiento de proteínas recombinantes.

El empleo de estrategias distintas estrategias para la optimización de la expresión de proteína recombinante soluble desembocó en esfuerzos infructuosos. El uso de la cepa alternativa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL no mejoró de manera significativa la expresión de proteína soluble (figura 2-11). De igual forma la co-expresión con chaperonas no tuvo un efecto definitivo sobre la disminución en la formación de cuerpos de inclusión.

No obstante los niveles obtenidos de proteína soluble, aunque menores que los de la fracción insoluble, permiten implementar su purificación mediante cromatografía de afinidad a Níquel a fin de enriquecer la banda de interés en una futura estrategia de purificación total de la proteína recombinante.



### 3.4 De la purificación de la 6xHisTcNMNAT.

Como bien se observó en la sección de resultados, la purificación parcial de la 6xHisTcNMNAT se llevó a cabo por medio de cromatografía de afinidad a Níquel (Ni-NTA); metodología que mostro lo mejores resultados. Posiblemente por sus numerosas ventajas como método de purificación.

El sistema 6xHis/Ni-NTA es muy utilizado para purificar por afinidad proteínas recombinantes y péptidos antigénicos; gracias a su rapidez y versatilidad. Este sistema se basa en la unión de seis residuos de histidina consecutivos (la etiqueta 6xHis) a los iones de níquel inmovilizados, dando una interacción altamente selectiva que permite la purificación de proteínas etiquetadas y/o complejos oligoméricos de la misma. (Crowe et al. 1994) De hecho es el anillo de imidazol de la cadena lateral de los residuos de histidina el que es afín por los iones de níquel de la resina Ni-NTA-agarosa de la columna. Además la estrecha asociación entre la etiqueta y la resina permite que los contaminantes sean lavados fácilmente y las proteínas unidas se pueden eluir suavemente por competencia con imidazol, o una ligera reducción en el pH. (Crowe et al. 1994; Gaberc-Porekar and Menart 2001). Además a estas ventajas se suman: una alta estabilidad de ligando en la resina, la alta capacidad carga de proteínas, una regeneración de la resina simple y de bajo costo, la poca frecuencia con que se presentan residuos de histidina vecinos en las proteínas de origen natural, y el hecho de que en la mayoría de los casos las etiquetas de histidina no afectan el plegamiento de proteínas, ni interfieren significativamente con la funcionalidad biológica. En consecuencia el uso de esta cromatografía de afinidad fue un gran acierto, pues claramente el 6xHis es una marca efectiva en la captura de la proteína y la elución con imidazol (empleada en el presente estudio) permitió un enriquecimiento de la proteína recombinante sin eliminar su actividad enzimática. Lo cual fue muy propicio para los objetivos de este trabajo.

Sin embargo cabe notar que, como lo muestra la figura 2-13, En un principio el sistema de purificación no mostró su mejor desempeño; pues los eluidos correspondientes presentaban en un principio un gran número de impurezas indetectables por Western blot; lo cual implica que el contenido de histidina de las mismas es pobre o solo está

disponible para interactuar con la resina. Ciertos autores consideran que en comparación con otras tecnologías de separación por afinidad, los sistemas IMAC (Cromatografías de afinidad por iones metálicos inmovilizados) no se puede clasificar como altamente específicos, sino como sistemas de especificidad moderada (Gaberc-Porekar and Menart 2001). Por lo cual fue necesario pasar por varias etapas de estandarización como se puede observar desde la figura 2-16 hasta la figura 2-19. La primera condición estandarizada, con resultados exitosos fue el aumento del Factor de concentración (Figura 2-16). Al aumentar la razón existente entre el volumen de cultivo inicial y el volumen de *buffer* de lisis con el cual se extrae la fracción soluble (y en consecuencia la concentración de proteína total) permitió una relativa clarificación de los eluidos y observar por primera vez actividad enzimática en estos. Esta práctica es recomendada en caso de purificaciones a partir de fracciones con una baja expresión de proteína recombinante (Gu, Stephenson, and Iadarola 1994). En segunda instancia la estandarización de un esquema de purificación fue un paso crucial en la obtención de eluidos altamente enriquecidos y con muy pocos contaminantes como se observa en las figuras 2-17, 2-18 y 2-19. Esta estrategia fue necesaria dado que al expresar proteínas recombinantes en *E. coli* es común que muchas proteínas del "hospedero" se adhieran fuertemente a las matrices de IMAC (especialmente cuando poseen iones Cu (II) o Ni (II) iones en la fase estacionaria). Esto hace que dichos contaminantes sean eluidos con la proteína diana a altas concentraciones del competidor; por lo cual, para la selección de la etiqueta de histidinas propia de las proteínas recombinantes del sistema de expresión, es necesario eluir la proteína diana dentro de una ventana "libre de contaminantes" (Gaberc-Porekar and Menart 2001).

Por otra parte, el aumento progresivo de la concentración de imidazol en el *buffer* de lavado conlleva a una mayor astringencia en los lavados, pero a costa del detrimento en la unión de la proteína de interés. Esto se observa notablemente en las figuras 2-18 y 2-19. No obstante se considera como un sacrificio justificable, teniendo en cuenta la disminución en el número de contaminantes en los correspondientes eluidos.

En la cromatografía de filtración en gel, La resina *sephadex* G-75 se empleó como parte de una estrategia de purificación en grupos, con el objetivo de deshacerse de las proteínas de bajo peso molecular. Tal objetivo se alcanzó exitosamente, como se muestra en el SDS-PAGE de la figura 2-14. Sin embargo el respectivo Western blot

también se observa que la proteína fue eluida dentro de las primeras fracciones de la cromatografía de exclusión. Ello sugiere la que interactuó pobremente con la resina. La resina empleada posee un rango de fraccionamiento de 3kDa a 80KDa (Mori and Barth 1999) teniendo en cuenta que la proteína recombinante consta de un peso de 35kDa, es posible que la formación de oligómeros sea responsable los tiempos de elución observados. Es posible emplear una resina de poro más grande para un rango de fraccionamiento más acorde con el posible estado multimérico de la proteína nativa. Cabe tener en cuenta que tales oligómeros, puede obedecer a un cambio en las propiedades de oligomerización de la 6xHisTcNMNAT a causa de la etiqueta de histidinas; como se ha reportado en estudios anteriores (Gaberc-Porekar and Menart 2001).

### 3.5 De la Determinación y caracterización de la actividad enzimática.

De acuerdo con los ensayos enzimáticos evaluados por RP-HPLC y presentados en la figura 2-20, los eluidos correspondientes a la purificación de la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT, presentan actividad enzimática frente a dos sustratos comúnmente utilizados por la familia de las NMNAT; el Mononucleótido de Nicotinamida (NMN) y el Mononucleótido de ácido nicotínico (NAMN). Este resultado en conjunción con los anteriores es prueba de la identidad de esta proteína como una NMNAT. En consecuencia ello constituye la primera identificación de una NMNAT en *Trypanosoma cruzi*. Este hallazgo representa un avance importante hacia la comprensión de la biosíntesis de nucleótidos de piridina en protozoos parásitos; así mismo establece una primera aproximación al metabolismo del NAD<sup>+</sup> en *T. cruzi*, partiendo la comprensión de los elementos responsables de su síntesis.

Todas las vías conocidas que conducen a la síntesis de NAD<sup>+</sup> requieren a la NMNAT. Esta enzima es de crucial importancia para el metabolismo, el suministro energético y la transducción de señales en este parásito (Gossmann et al. 2012), además de ser un elemento importante en el control del estrés oxidativo y la resistencia a fármacos. Por lo

tanto, la NMNAT de *T. cruzi* (TcNMNAT) representa un blanco potencial para el desarrollo de futuros fármacos y otras estrategias terapéuticas, como se ha planteado en otros parásitos intracelulares (Sorci et al. 2009).

Es posible que los niveles del NAD<sup>+</sup> en este organismo dependan exclusivamente de la expresión de la NMNAT identificada en este trabajo, ya que no se encontraron otras enzimas estructuralmente relacionadas en el presente estudio. Sin embargo es necesario emplear otras estrategias de búsqueda para así identificar nuevos candidatos que no cumplan con los parámetros actuales de predicción.

La producción de NAD<sup>+</sup> en el parásito podría explicarse por la toma de precursores provenientes del hospedero, o por la toma directa de NAD<sup>+</sup> desde este; ya que aún se requieren estudios que permitan saber el perfil de expresión del gen correspondiente a la TcNMNAT en los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. Cabe notar que la figura 2-20 da cuenta de la primera NMNAT identificada en todo el género *Trypanosoma*; el cual comprende varios agentes patógenos para el hombre y otros mamíferos de importancia económica. Por ende la TcNMNAT se perfila como un punto de partida en la comprensión de la ruta de síntesis de NAD<sup>+</sup> de este parásito.

Para la determinación y la caracterización enzimática de la 6xHisTcNMNAT se optó por realizar un ensayo enzimático directo y de punto final, de acuerdo con las metodologías utilizadas para la determinación cinética de otras NMNAT (Balducci, Emanuelli, and Raffaelli 1995; Monica Emanuelli et al. 1999, 2003).

Los ensayos directos se definen como aquellos en donde existe una medición inmediata de la concentración de producto (o sustrato) en función del tiempo. Este tipo de ensayos es preferible frente a aquellos que impliquen acoplar la generación de producto a una reacción no enzimática (ensayo indirecto) o a una reacción catalizada por una segunda enzima (ensayo acoplado; siempre y cuando la concentración de producto o sustrato pueda medirse de manera precisa mediante esta forma (Copeland 2004).

Una de la razones por la cuales los ensayos directos son preferibles frente a otro tipo de ensayos es su facilidad para estandarizar y así obtener lecturas correctas de la velocidad de la reacción. En otro tipo de ensayos, como los acoplados, generalmente el analito que se mide es el producto de la reacción acoplada; pero lo que se desea saber es la

velocidad de aparición de producto en la reacción inicial (el cual a su vez es el sustrato de la reacción acoplada). Por lo tanto en estos ensayos se debe garantizar que la reacción inicial constituye el paso límite del sistema (ej. Usando una reacción acoplada mucho más rápida que la reacción inicial), y que la concentración del producto en la misma alcance un *equilibrio estable* (Copeland 2004). Para que se cumpla esta segunda condición existe una fase de retraso, mientras el producto de la reacción inicial se acumula para llegar a dicho *equilibrio estable*. Como tal fase de retraso es anterior al comportamiento lineal que se espera del sistema entre la concentración de producto y el tiempo de la reacción, el no detectarla y tenerla en cuenta en los cálculos puede llevar a determinaciones incorrectas de la velocidad (Copeland 2004); un inconveniente que no ocurre en el caso de los ensayos directos.

Por otra parte los ensayos de punto final o ensayos discontinuos, se definen como aquellos en donde se mide una sola señal específica en un punto en el tiempo dentro del periodo lineal de la reacción; en este caso la velocidad se determina dividiendo la señal por el intervalo empleado. Estos ensayos no son la forma más segura de medir velocidades de reacción en contraste con los ensayos continuos. No obstante son compatibles con técnicas de separación como el HPLC (Copeland 2004).

El ensayo enzimático directo basado en HPLC que se empleó en el presente estudio, fue concebido por Balducci y colaboradores, como una metodología para monitorear sustratos alternativos, y reacciones secundarias que podrían interferir con la reacción principal catalizada por una NMNAT (Balducci, Emanuelli, and Raffaelli 1995). Teniendo en cuenta que la 6xHisTcNMNAT proviene de los eluidos de una purificación parcial, se consideró necesario emplear una metodología que proveyera la mayor información posible sobre lo que ocurriría en el sistema (incluyendo posibles reacciones secundarias). Por lo cual el ya mencionado ensayo enzimático directo basado en HPLC se presentó como la mejor opción a pesar de los inconvenientes presentados.

Hablando de la caracterización cinética de la 6xHisTcNMNAT, lo primero que se llevó a cabo fue la estandarización del intervalo en el que la reacción catalizada posee una cinética lineal. Para ello se observó el comportamiento de síntesis de  $\text{NAD}^+$  en función del tiempo, como se encuentra registrado en la figura 2-22.

Determinar un intervalo de linealidad es muy importante para la posterior caracterización cinética de la enzima, ya que para esto se necesita medir acertadamente un valor de

velocidad inicial. Si se tiene en cuenta que, para una reacción catalizada, la aparición de producto (o desaparición de sustrato) en función del tiempo es similar a una cinética de primer orden, es claro que inicialmente la concentración del producto y el tiempo guardan una relación lineal; pero dicha linealidad se pierde conforme el sustrato se agota. Cuando ambas variables se relacionan linealmente se puede adjudicar a la pendiente de la recta un valor de *velocidad inicial*, para una concentración de sustrato dada (Copeland 2004); simplificando notablemente el cálculo esta medida .

En el caso de los ensayos de punto final, como el empleado en el presente estudio, La velocidad inicial se calcula a partir de la cantidad de producto formado en un intervalo específico. Para que la estimación de la velocidad sea acertada, dicho intervalo debe encontrarse por dentro del mencionado lapso de linealidad; preferiblemente cerca de la mitad de tal intervalo (Copeland 2004).

Para una reacción catalizada por una enzima, el periodo de linealidad en función del tiempo puede variar dependiendo de condiciones experimentales (Copeland 2004; Marangoni 2003). Por ello se recomienda que la respectiva curva sea realizada al menos bajo distintas condiciones de cantidad de enzima y concentración de sustratos, a fin de observar un comportamiento reproducible en esta (Copeland 2004). En el presente estudio se evaluó la síntesis de NAD<sup>+</sup> en función del tiempo, bajo dos sets distintos de condiciones: una curva de progreso con 1,25µg de enzima y 5mM de sustratos (ATP y NMN), y una segunda curva usando 0,25µg de enzima y 1mM de sustratos. En ambos casos se observó linealidad hasta llegados 20 minutos de reacción. Esto sugiere que el periodo de linealidad presentado en este trabajo es reproducible y que en consecuencia el intervalo sugerido para la realización de los ensayos (15 minutos) es confiable.

Cabe notar que si bien en posteriores ensayos enzimáticos la cantidad de enzima se llevó a valores menores que 0,25µg. Esto en principio no debería disminuir la extensión del periodo en que la reacción es lineal ya que el cambio en la cantidad de enzima no afecta la curvatura de la curva de progreso; por el contrario disminuir la concentración de enzima se considera beneficioso ya que se disminuye en proporción la parte de la curva que no puede ser observada (Cornish-Bowden 2013). De hecho, dado que a menor cantidad de enzima hay menor actividad enzimática y menor consumo de sustrato. Por lo que en teoría tomaría aún más tiempo el que la aparición de NAD<sup>+</sup> en función del tiempo

perdiese su linealidad (*Comunicación personal, Profesora María Helena Ramírez Hernández*).

En la figura 2-22 también llama la atención como la actividad enzimática a los 40 minutos de reacción cae por debajo de los valores observados a los 30 minutos. Para explicar este comportamiento es bueno recordar que la meseta característica para estas curvas de progreso suele ser un indicativo de que la reacción se ha completado; sin embargo dicha meseta puede surgir antes del agotamiento de los sustratos. Esta finalización prematura de la reacción puede darse por múltiples razones, como la inestabilidad de la enzima, los sustratos, la presencia de un inhibidor de unión lenta, o inhibición por producto (Copeland 2004). En el cromatograma correspondiente al tratamiento de 40 minutos de la figura 2-22 se observaron aún los picos para el NMN y el ATP; por lo que es lógico pensar que la meseta de la curva de progreso surge antes de la aparición de los sustratos. Entonces, la repentina disminución en el incremento paulatino de la actividad y el inesperado decaimiento para el tratamiento a 40 minutos, puede explicarse por la inestabilidad de la enzima dentro de las condiciones del experimento. Ello pudo llevar a la degradación masiva de esta para tiempos cercanos a los 40 minutos, disminuyendo así la actividad.

Esto no quiere decir que el tiempo estimado para la realización del ensayo discontinuo no se encuentre dentro de la fase lineal de curva de progreso. Por el contrario de no presentarse una finalización temprana de la reacción, esta linealidad podría extenderse incluso un tiempo mayor. En consecuencia no existen razones para pensar que el periodo comprendido entre los 0 y los 20 minutos en la curva, carezca de la linealidad que se observa en la figura 2-22.

Tras establecer un tiempo propicio para la realización de los ensayos, lo segundo a determinar fue la temperatura óptima de estos. Aquí se evaluó la producción de  $\text{NAD}^+$  en función de diferentes temperaturas, para concluir que a valores cercanos a los  $30^\circ\text{C}$  se registra la mayor actividad enzimática por parte de la 6xHisTcNMNAT (figura 2-23).

La temperatura es un factor importante a controlar ya que determina la velocidad de las reacciones químicas, mediante el efecto que ejerce sobre la constante de velocidad de la reacción (Marangoni 2003). Por ello es importante establecer un valor de temperatura en la determinación de constantes cinéticas a fin de garantizar reproducibilidad experimental. No obstante varios autores consideran que la temperatura óptima, como

propiedad intrínseca de la enzima, es un concepto desacreditado (Cornish-Bowden 2013; Daniel, Danson, and Eisinger 2001). La temperatura óptima se supone como un parámetro de dudosa validez y valor limitado, debido a que surge de una mezcla desconocida de la estabilidad térmica de la enzima y coeficiente de temperatura (Daniel, Danson, and Eisinger 2001). De acuerdo con esta afirmación, la parte ascendente de la figura 2-23 estaría mostrando solo el efecto del incremento de la temperatura sobre la constante de velocidad de la reacción catalizada. Cuando la temperatura llega un punto en el que la desnaturalización de la enzima se hace significativa (Temperaturas superiores a los 30°C) la parte descendente del gráfico consistiría en una combinación entre el primer efecto mencionado y la estabilidad térmica de la enzima. Dado que la contribución de la denaturación enzimática depende tanto del tiempo, como de la temperatura, el óptimo aparente debería desplazarse a temperaturas más bajas si se usasen tiempos más largos para el ensayo enzimático (Copeland 2004; Daniel, Danson, and Eisinger 2001). Cabe mencionar también que esta perspectiva contrasta con trabajos que sugieren que al menos algunas enzimas tienen una temperatura óptima genuina; ya que por encima de una cierta temperatura la enzima se inactiva reversiblemente, antes de que la denaturación proteica (inhibición irreversible) tuviese una influencia significativa (Daniel, Danson, and Eisinger 2001; Thomas and Scopes 1998).

Independientemente del valor intrínseco que pueda o no tener el parámetro de temperatura óptima se considera que el reporte de la misma es necesario para proveer información suficiente sobre factores que pueden afectar el comportamiento de la velocidad enzimática. Además el escenario ideal para la realización de un ensayo enzimático implica medir la actividad a una temperatura que soporte una alta actividad enzimática y no conduzca a una denaturación significativa de la proteína (Copeland 2004). En consecuencia se considera necesario complementar a futuro este resultado, con una evaluación de la actividad enzimática ampliando el rango de temperaturas cercanas a los 30°C; Así se obtendría un valor más exacto, que de acuerdo con la literatura puede ser más informativo respecto al mecanismo de reacción, al restar el efecto generado por la denaturación de la proteína (Copeland 2004).

Por otra parte, la temperatura óptima registrada en el presente estudio (30°C) se encuentra tan alejada del valor de esperado en un principio, 37°C; asumiendo que *T.*



*cruzi* tiene como hospedero final un mamífero. Este hallazgo es interesante, porque si bien el parásito puede no necesitar que la enzima trabaje bajo un óptimo de temperatura, es evidente que la temperatura óptima es más cercana a la temperatura corporal que podría tener el vector triatomíneo en su ambiente natural. Por lo tanto es factible especular que esta enzima podría ser más activa en el estado Epimastigote que normalmente parasita a este vector. Sería interesante saber conocer los patrones de expresión de esta proteína y su correspondiente gen, en los diferentes estadios del parásito.

Para la determinación de pH óptimo se evaluó la producción de  $\text{NAD}^+$  bajo un rango de valores que va desde 3,4 hasta 9,5 como observa en la figura 2-24. A partir de tal resultado se optó por determinar tentativamente el pH 7,5 como el pH óptimo para la catálisis de la reacción. El gráfico correspondiente (figura 2-24) muestra una actividad toscamente similar a la forma de campana que generalmente se observa frente a un perfil de pH. La disminución de la actividad en ambos extremos de la campana es generalmente atribuida a dos tipos de causas. Por un lado el pH puede afectar a la estabilidad de la enzima, denaturándola e inactivándola irreversiblemente. En segundo lugar el pH puede afectar a los parámetros cinéticos de la reacción enzimática: como la estabilidad del complejo Enzima-Sustrato (ES), la velocidad de paso límite de la reacción, o ambos (Marangoni 2003). Normalmente, se ha encontrado que una enzima se mantiene estable dentro de un rango de pH de alrededor de 4 a 5 unidades; sin embargo dentro de dicho rango la velocidad también varía con el pH (Copeland 2004). Teniendo en cuenta que en la figura 2-24 los ensayos duraron 15 minutos, se puede afirmar que las velocidades varían en función del pH. De igual forma existe una ventana entre pH 6,8 y pH 10, donde la velocidad no se encuentra extremadamente reducida, sin embargo en este rango la velocidad sigue variando en función del pH; con un máximo en 7,5. Es plausible que dentro de la mencionada ventana el efecto de la denaturación de la enzima no sea significativo, y la variación en la velocidad se deba al efecto que el pH podría ejercer sobre los parámetros cinéticos de la reacción catalizada.

Para comenzar propiamente con la determinación de constantes cinéticas se hizo una evaluación preliminar de la velocidad de síntesis de  $\text{NAD}^+$  en función de la concentración de sustrato; tanto para el ATP como para el NMN. Esto se muestra en la figura 2-25. Sin embargo al observar que el NMN no mostraba aún una cinética de saturación, se decidió

en primera instancia aumentar el rango de concentraciones y eventualmente disminuir la cantidad de enzima empleada como se muestra finalmente en la figura 2-26. En esta figura se dio una aparente saturación en la curva correspondiente a 0,083µg de enzima; sin embargo esto ocurrió a costa de una disminución abrupta de la actividad en la curva control, disminución que se aprecia también a 0,125µg de enzima. La curva control es comparable con la curva para el NMN en el sentido de que se manejan las mismas proporciones entre la enzima, el sustrato en saturación (de concentración constante en todos los tratamientos) y el sustrato evaluado. Ante tal problema se pensó inicialmente en el efecto que podría estar causando el ATP en el ensayo enzimático en sí, y se llegó a dos conclusiones. La primera tuvo en cuenta presencia apreciable de especies de ATP cargadas en soluciones con  $MgCl_2$  ( $MgATP^{2-}$ ,  $ATP^{4-}$  y  $HATP^{3-}$ ) (Storer and Cornish-Bowden 1976); por lo cual a altas concentraciones de ATP se superaría la capacidad del *buffer* y se acidificaría el pH del sistema, afectando la actividad de la enzima. La Segunda conclusión tuvo en cuenta la especie “utilizable” por la enzima; el  $MgATP^{2-}$ . Esta constituye el 80% de la solución si la concentración de  $MgCl_2$  excede a la concentración total de ATP en un rango de 1 a 10mM; pero si se sale de tal proporción, el porcentaje  $MgATP^{2-}$  variaría enormemente (Storer and Cornish-Bowden 1976). Entonces, las concentraciones de esta especie de ATP y/o las de magnesio libre (que resulta ser el cofactor de la enzima) pueden verse seriamente comprometidas, disminuyendo así la eficiencia del ensayo.

Para probar que tan ciertas eran conclusiones anteriores se efectuaron los experimentos graficados en la figura 2-27. Para tal sorpresa que ninguna variación en el  $MgCl_2$  y *buffer* HEPES, revirtió de manera significativa el comportamiento de la curva control a pesar de observar ciertas mejoras y ventajas. A partir de este resultado se tuvo en cuenta una nueva posibilidad, la presencia de inhibición por sustrato en el sistema. En esencia las curvas del ATP en las figuras 2-26 y 2-27 poseen atributos importantes que las clasifican como propias del mencionado fenómeno; valores de velocidad menores a los esperados, bajo altas concentraciones iniciales del sustrato a evaluar (Copeland 2004; Wang et al. 1999). Sin embargo para confirmar se evaluaron los gráficos de dobles recíprocos esperando una dramática curvatura hacia arriba en las regiones cercanas al eje de las ordenadas, un aspecto propio de la inhibición por sustrato según la literatura (Copeland 2004). Lo que efectivamente se observó en la figura 2-28.

Otra causa de la desviación de la cinética hiperbólica es la presencia de más de una enzima que actúe sobre el mismo sustrato en el ensayo enzimático. Esto suele ocurrir cuando se trabaja con enzimas parcialmente purificadas, donde se producen desviaciones de los resultados cinéticos esperados. Sin bien estos casos se obtienen comportamientos muy distintos a hipérbola rectangular estándar, esta curva es una combinación del comportamiento individual para cada población enzimas; un comportamiento que carece de la caída en la velocidad a altas concentraciones de sustrato, que caracteriza a la inhibición por sustrato (Copeland 2004).

La inhibición por sustrato es el caso más frecuente de desviación de la cinética hiperbólica que caracteriza al gráfico de *Michaelis-menten*. Este fenómeno ocurre cuando una segunda molécula de sustrato puede unirse al complejo ES para formar un complejo ternario inactivo Sustrato-Enzima-Sustrato (SES). Como la formación del complejo ES precede a la formación del complejo SES, esta inhibición por lo general sólo se observa a altas concentraciones de sustrato y como un valor menor que el esperado para la velocidad. A bajas concentraciones de sustrato, la cinética sigue comportamiento tipo *Michaelis-Menten* pero por encima de una concentración crítica de sustrato, los datos se desvían significativamente del comportamiento esperado (Copeland 2004).

La Inhibición de sustrato se interpreta a menudo como una anomalía que proviene del uso de concentraciones de sustrato artificialmente altas en ensayos *in vitro*. De ahí el elevado desinterés en su estudio a pesar de su universalidad. No obstante, existen varias razones para sospechar que este tipo de inhibición no es un mero inconveniente en el experimento, sino un mecanismo de regulación biológicamente relevante: primero que todo en muchos casos, el “pico” de la curva acampanada que se observa para esta inhibición se encuentra dentro de rangos de concentraciones fisiológicas de sustrato; lo que indica que estas enzimas funcionan normalmente en virtud de la inhibición por sustrato. En segundo lugar, muchas enzimas tienen sitios especializados donde una segunda molécula de sustrato puede unirse y actuar como un inhibidor alostérico. Para aquellas enzimas, la inhibición por sustrato es claramente una adaptación evolutiva. Por último; existe evidencia acumulada de que la inhibición por sustrato desempeña funciones regulatorias importantes en distintas rutas metabólicas (Reed, Lieb, and Nijhout 2010).

En el caso de la 6xHisTcNMNAT se cumplen posiblemente dos de las razones mencionadas. En vertebrados, la concentración de ATP intracelular es típicamente 1-10mM (Beis and Newsholme 1975). Dentro de este rango también se observa para la enzima de este estudio el máximo en la velocidad con el ATP, antes de que esta decaiga; especialmente bajo concentraciones cercanas a los 10mM. Por otra parte no solo la TcNMNAT sino que otras NMNAT como la isoenzima humana de esta familia, muestran inhibición por sustrato altas concentraciones de ATP (M Emanuelli et al. 2001; Monica Emanuelli et al. 1992) por lo que en teoría deberían contar con al menos un sitio alostérico; lo que sugiere una adaptación regulatoria con un posible rol a desempeñar en el metabolismo celular.

En consecuencia el hallazgo de inhibición por sustrato para la 6xHisTcNMNAT es potencialmente importante, ya que de existir una función biológica para este comportamiento, se conocería mucho más sobre las conexiones entre la ruta de síntesis del NAD<sup>+</sup> y condiciones fisiológicas como los niveles intracelulares de ATP. Se sobrentiende que profundizar sobre esta inhibición en la 6xHisTcNMNAT sería muy interesante.

La confirmación de una inhibición por parte del ATP, obligó a replantear los experimentos para la saturación del NMN. Por ello se buscó estandarizar una curva de saturación utilizando concentraciones desde 0 hasta 7,5mM de NMN, junto con una concentración de sustrato en saturación ATP de 7,5mM. Esto se observa en la figura 2-29. El resultado muestra que la curva control ya no presenta la un comportamiento de inhibición y la curva del NMN ya no muestra la presunta saturación observada en algunos de los experimentos anteriores. Cabe resaltar de este experimento dos cosas: la primera es que dado el comportamiento del control las condiciones son propicias para la determinación de constantes, respecto a la concentración de sustratos. Lo segundo es que de acuerdo con los valores de velocidad del último tratamiento en ambas curvas (ATP y NMN) ambas al parecer poseen la misma velocidad máxima. Las velocidades máximas deben tender a ser iguales para ambos sustratos, dado que en este punto de la gráfica de saturación la velocidad solo debe depender de la concentración de enzima (Copeland 2004). Para confirmar estas estimaciones, se extrapolaron los valores de  $V_{max}$  mediante gráficos de *Lineweaver-Burk* para ambas curvas. Las velocidades máximas estimadas fueron: 0,91 $\mu$ M/min (ATP) y 0,74 $\mu$ M/min (NMN) con 0,125 $\mu$ g de enzima y 0,71 $\mu$ M/min (ATP) y

0,56  $\mu\text{M}/\text{min}$  (NMN) con 0,083  $\mu\text{g}$  de enzima. Si bien las velocidades máximas extrapoladas no son idénticas (lo que es común encontrar en este tipo de estudios) si son muy cercanas, lo cual es un aspecto positivo de las condiciones estandarizadas.

Como no era posible aumentar el rango de concentraciones del NMN se redujo la cantidad de enzima a 0,063 $\mu\text{g}$  en la figura 2-30. En el apartado A de esta figura se presenta para el NMN un comportamiento que bien podría indicar la saturación de la enzima con el sustrato en cuestión. La observación los datos numéricos de la velocidad de la curva del NMN (esquematizados en el apartado B de la figura 2-30) Muestra que el cambio en la velocidad disminuye tendiendo a cero mientras la concentración de sustrato aumenta, como también se aprecia en la curva control. Lo cual marca la independencia entre la velocidad y la concentración de sustrato inicial, bajo altos valores de este último (Copeland 2004). La calidad y la precisión de las estimaciones de constantes cinéticas, depende de que el intervalo de concentraciones de sustrato que se extienda por una parte significativa de la isoterma de unión del sustrato a la enzima. Si las mediciones se realizan sólo a bajas concentraciones de sustrato, la curva debe lucir como una reacción de primer orden dentro de este rango, y como los sitios activos de la enzima con alcanzan un saturación los valores de  $V_{\text{max}}$  y  $K_{\text{m}}$  gráficamente, tenderían hacia el infinito. Por el contrario, si la curva se realizase solo concentraciones muy elevadas de sustrato La velocidad luciría todo el tiempo como si fuese casi independiente de la concentración de sustrato; se podría hacer una estimación aproximada de la  $V_{\text{max}}$  pero no habría manera de determinar el  $K_{\text{m}}$  (Copeland 2004). La curva para el NMN en la figura 2-30 no coincide en su aspecto con ninguno de los errores mencionados en este párrafo; en consecuencia existen argumentos para afirmar se cuenta con una curva lo suficientemente completa para la determinación de las constantes cinéticas.

Teniendo en cuenta las curvas de las figuras 2-30 y 2-31, se calcularon las constantes cinéticas para el NMN y el ATP; registradas respectivamente en las tablas 2-9 y 2-10. Para ello se emplearon tres métodos distintos de regresión lineal; *Lineweaver–Burk*, *Eadie–Hofstee* y *Hanes–Woelf*. Es justo y necesario notar que los métodos empleados poseen marcadas limitaciones y sesgos, sin embargo el que los valores determinados sean tan similares entre sí, dota de robustez a los resultados. De hecho lo normal es que las estimaciones de la  $V_{\text{max}}$  y el  $K_{\text{m}}$  consten de diferentes valores por diferentes métodos,

a menos que los datos estén libres de errores, pues cada uno maneja un conjunto diferente de supuestos sobre la distribución del error (Atkins and Nimmo 1975).

En el método diseñado por *Lineweaver y Burk* en 1934 representa gráficamente el recíproco de la velocidad inicial como una función del recíproco de la concentración inicial de sustrato. El  $K_m$  y la  $V_{max}$  se estiman partiendo de los valores de pendiente y la intersección de la regresión lineal de los datos (Atkins and Nimmo 1975; Copeland 2004). El problema con este método radica en que para datos experimentales reales, pequeños errores en las mediciones de la velocidad se amplifican al realizar esta transformación. Esto ocurre especialmente donde el error suele ser mayor; en los valores de velocidad medidos a bajas concentraciones de sustrato. Por desgracia en este método, los valores más bajos de la concentración de sustrato se corresponden con los valores más altos de su recíproco, y dada la regresión lineal, estos puntos de datos se ponderarán más fuertemente en el análisis. Lo cual desemboca en una apreciación desigual del error experimental, llevando a estimaciones pobres de las constantes cinéticas aun cuando el error experimental es relativamente pequeño (Copeland 2004; Dowd and Riggs 1965). No obstante, los gráficos de *Lineweaver-Burk* siguen siendo comúnmente utilizados por muchos investigadores y son herramientas valiosas para ciertos propósitos; como en el diagnóstico de los detalles mecanicistas de enzimas multi-sustrato y para determinar el modo de interacción entre una enzima y un inhibidor (Copeland 2004).

Otras transformaciones lineales de la curva de *Michaelis-menten*, como los gráficos de *Eadie-Hofstee*, consisten en representar la velocidad como una función de la razón entre esta y la concentración de sustrato. Esta relación se asume como lineal, por lo cual el  $K_m$  y la  $V_{max}$  se estiman a partir de la pendiente y el intercepto. Por otra parte los gráficos de *Hanes-Woolf* se constituyen de la representación de la razón entre la concentración de sustrato y la velocidad, como una función de la concentración de sustrato. En este gráfico la pendiente es un estimado del inverso de la  $V_{max}$ , el intercepto en el eje de las ordenadas es la razón  $K_m / V_{max}$  y el intercepto en el eje de las abscisas es el negativo del  $K_m$  (Copeland 2004).

El problema con estos métodos radica en que la ordenada y la abscisa no representan variables independientes; o ambas dependen de la concentración de sustrato (*Hanes-Woolf*) o ambas dependen de la velocidad (*Eadie-Hofstee*); lo cual implica que el error

actúa sobre la posición de un punto en ambos ejes y medidas como el coeficiente de correlación son irrelevantes. En el caso del método de *Hanes-Woolf*, incluir el recíproco de la velocidad en la respectiva ecuación tiende a dar un énfasis indebido a los valores más pequeños de la velocidad; que son sólo los que suelen tener el mayor porcentaje de error (Dowd and Riggs 1965).

La forma preferible para determinar constantes cinéticas es el ajuste de curvas por métodos no lineales, usando los datos sin transformar en la ecuación de *Michaelis-Menten*. Si bien estos métodos durante mucho tiempo no fueron asequibles, actualmente existen programas especializados para tal función (Copeland 2004). En consecuencia la estimación de las constantes cinéticas para la 6xHisTcNMNAT debería complementarse usando un método de estimación no lineal para el ajuste de curvas.

Retomando las tablas 2-9 y 2-10 es evidente que los valores registrados para para el  $K_m$ , en el caso NMN son mayores que en el caso del ATP. El  $K_m$  suele variar considerablemente de para una enzima en particular con diferentes sustratos y además se puede utilizar como una medida relativa de la afinidad de unión al sustrato. Sin embargo al considerarse como la concentración a la cual la velocidad es la mitad de la  $V_{max}$ , el  $K_m$  depende de la cantidad de enzima, dado que dicha condición es directamente proporcional a la velocidad (Copeland 2004). Esto hace que los valores de  $K_m$  estimados para el NMN no sean comparables con aquellos estimados para el ATP. Empero, también es cierto que a menores cantidades de enzima este el  $K_m$  debería disminuir en vista que la  $V_{max}$  también disminuye con la cantidad de enzima; por lo cual en un principio los valores de  $K_m$  determinados para el NMN deberían ser menores que los del ATP ya que se utilizó menos enzima. En consecuencia el que los  $K_m$  del NMN sean por el contrario mayores que los del ATP, sugiere que a pesar de no ser comparables, existe una mayor afinidad que posee la 6xHisTcNMNAT por el ATP ya que este presenta un menor  $K_m$  a pesar de utilizar mayores cantidades de enzima (0,083 $\mu$ g) en comparación con el experimento para el NMN (0,063 $\mu$ g).

En estas tablas también se resaltó anteriormente la diferencia existente entre los valores de  $K_{cat}$  determinados para ambos sustratos. El valor de  $K_{cat}$  se conoce como número de recambio, ya que define el número de eventos catalíticos que se producen por unidad de tiempo. Este define la velocidad máxima a la cual una reacción enzimática puede proceder, a una concentración fija de enzima y una disponibilidad infinita de sustrato

(Copeland 2004). El hecho de que los distintos valores de  $K_{cat}$  para ambos sustratos se parezcan, acercándose a  $0,20 \text{ s}^{-1}$ , es congruente con el hecho de que esta es una enzima bi-sustrato. Por otra parte la comparación de estos valores con los registrados en la base de datos BRENDA (Scheer et al. 2011; Schomburg et al. 2004) muestran que, tanto para el NMN como para el ATP, el  $K_{cat}$  se encuentra por debajo de los valores de isoenzimas mamíferas, pero muy por encima de los valores registrados para procariontes.

Por último es importante notar que, en comparación con las pocas eficiencias catalíticas registradas en la base de datos BRENDA (todas ellas provenientes del organismo *Mus musculus*, un mamífero) la 6xHisTcNMNAT al parecer es mucho menos eficiente, dado que se observan valores con dos y hasta 3 órdenes de magnitud mayores.



## 4. Conclusiones y recomendaciones

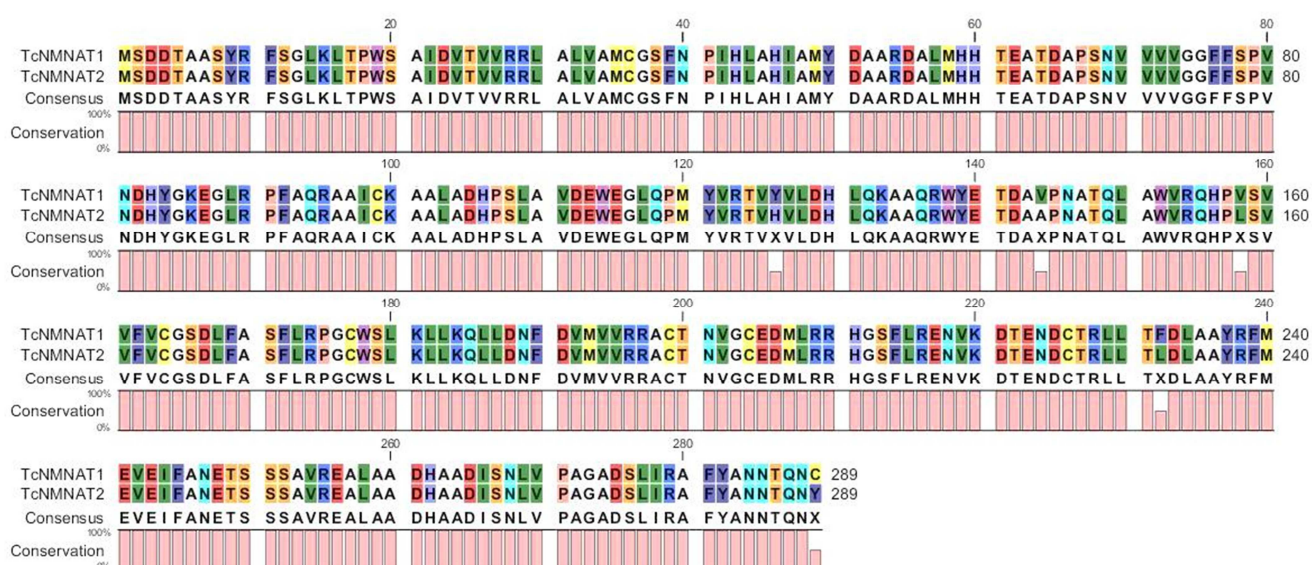
### 4.1 Conclusiones

- Se clonó y expresó exitosamente en el sistema heterólogo *Escherichia coli* la proteína recombinante 6xHisTcNMNAT, de aproximadamente 35kDa y que efectivamente corresponde a una NMNAT de *Trypanosoma cruzi*, de acuerdo con la actividad detectada en esta por medio de ensayos enzimáticos directos.
- Mediante la caracterización de actividad enzimática la 6xHisTcNMNAT, se establecieron sus constantes cinéticas, además de descubrir que esta presenta inhibición por sustrato a altas concentraciones de ATP.
- La Búsqueda bioinformática realizada permitió identificar un marco de lectura abierta codificante para una NMNAT en *Trypanosoma cruzi*. Dicho marco de lectura se encuentra presente como una única copia en cuatro genomas disponibles de distintas cepas de este parásito.
- La realización un estudio *in silico* de la proteína identificada permitió realizar una predicción de sus características, respecto a sus niveles de estructura, lo que permitió obtener argumentos *a priori* para llevar a cabo el subsecuente estudio experimental.
- La comparación entre el modelo bioinformático estructural de la NMNAT de *T. cruzi* con sus homólogos humanos, permitió detectar la presencia de una secuencia de aminoácidos exclusiva de la especie parásita la cual puede poseer un rol regulatorio en el funcionamiento de la enzima.

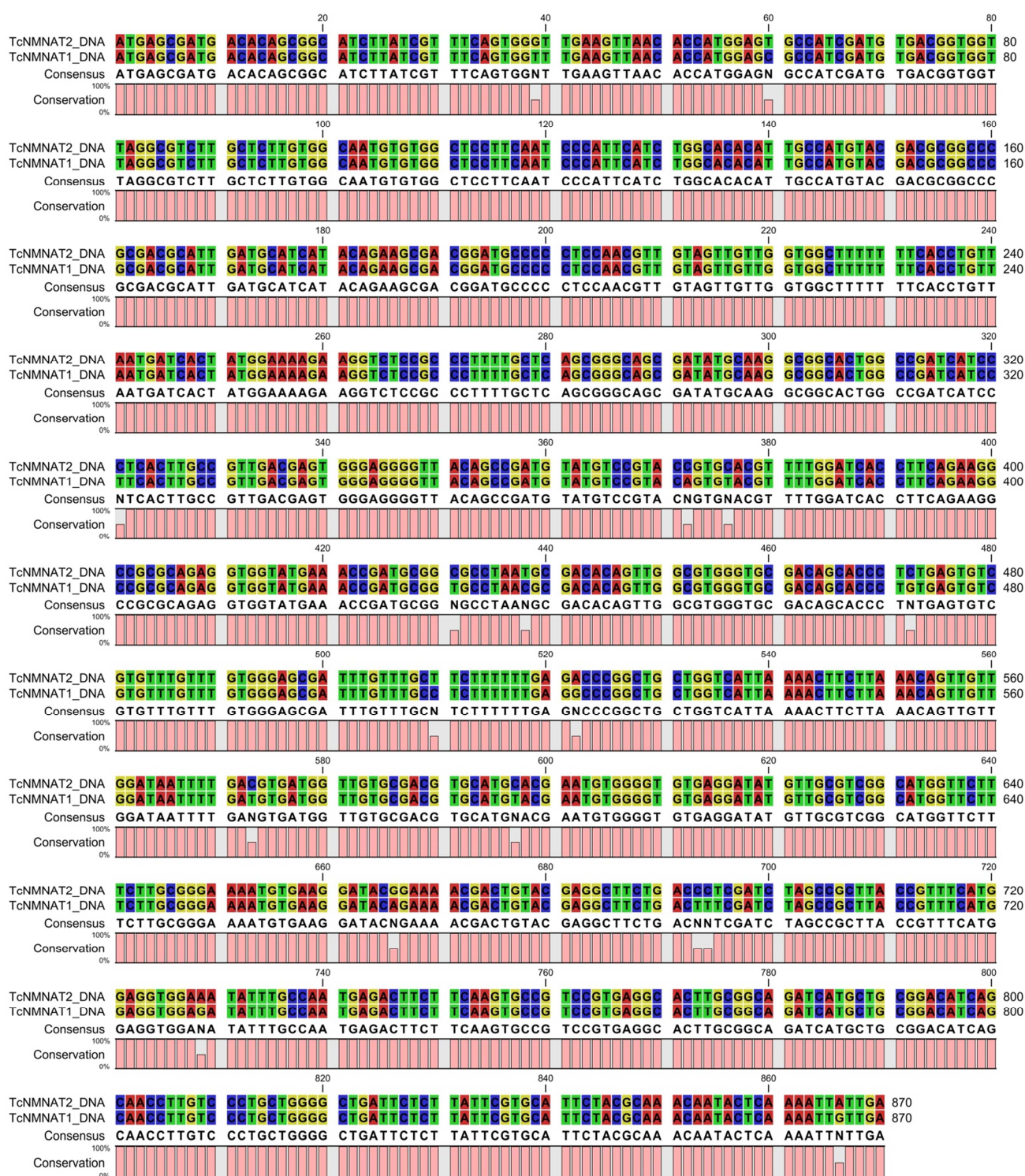
## 4.2 Recomendaciones

- Se sugiere la evaluación de otras cepas alternativas, distintas de la cepa BL21-*CodonPlus (DE3)-RIL*, en aras de optimizar la expresión de proteína recombinante soluble con el vector recombinante actual.
- De igual manera se propone realizar nuevas co-transformaciones con sistemas de sobre-expresión de chaperonas que codifiquen para las proteínas GroEL/GroES, DnaK/DnaJ/GrpE, ClpB, la HSP pequeñas de ser posible. De esa forma podría llegarse a un resultado más concluyente, y de igual forma se podría optimizar la expresión de proteína recombinante soluble.
- Se considera necesario realizar una evaluación de la actividad enzimática ampliando el rango de temperaturas cercanas a los 30°C, a fin de obtener un valor más exacto, para posteriores estudios.
- De igual manera se sugiere desarrollar un test de *Selwyn* (Selwyn 1965) a fin de determinar si existe degradación de la enzima durante la curva de progreso para la determinación del tiempo óptimo del ensayo enzimático.
- Se considera fundamental complementar la estimación de las constantes cinéticas para la 6xHisTcNMNAT usando un método de estimación no lineal para el ajuste de curvas. Teniendo en cuenta que este es el más confiable y acertado de determinación.

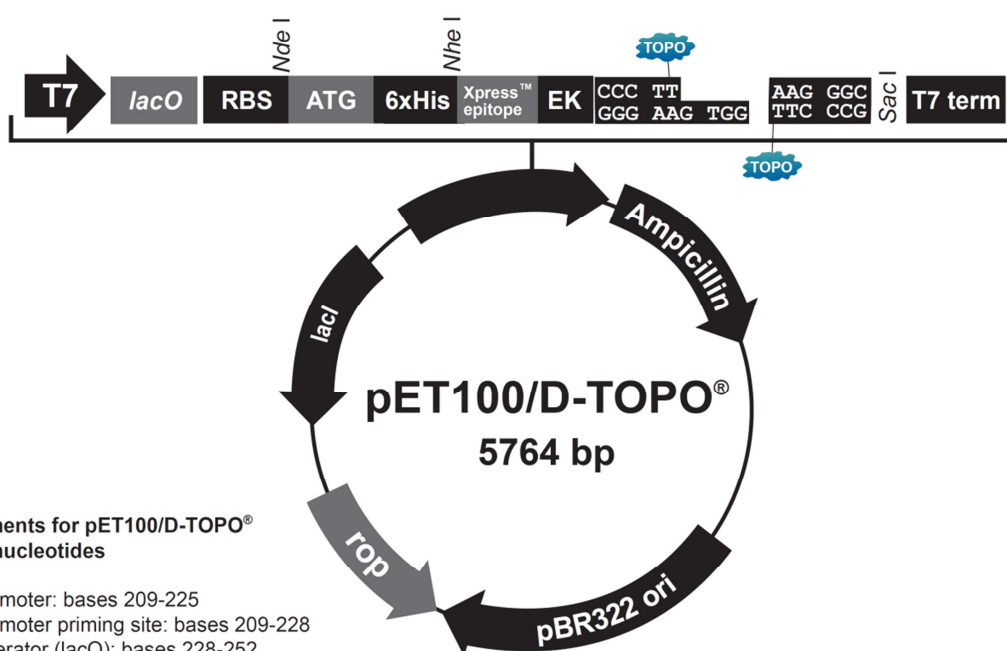
## A. Anexo: Alineamiento entre secuencias de aminoácidos de candidatos a la TcNMNAT.



## B. Anexo: Alineamiento entre secuencias de nucleótidos de candidatos a la TcNMNAT.



## C. Anexo: Mapa del vector pET100/D-TOPO.



### Comments for pET100/D-TOPO® 5764 nucleotides

T7 promoter: bases 209-225  
 T7 promoter priming site: bases 209-228  
 lac operator (lacO): bases 228-252  
 Ribosome binding site (RBS): bases 282-288  
 Initiation ATG: bases 297-299  
 Polyhistidine (6xHis) region: bases 309-326  
 Xpress™ epitope: bases 366-389  
 EK recognition site: bases 375-389  
 TOPO® recognition site 1: bases 396-400  
 Overhang: bases 401-404  
 TOPO® recognition site 2: bases 405-409  
 T7 reverse priming site: bases 466-485  
 T7 transcription termination region: bases 427-555  
 bla promoter: bases 856-954  
 Ampicillin (bla) resistance gene: bases 955-1815  
 pBR322 origin: bases 2022-2757  
 ROP ORF: bases 3001-3192 (complementary strand)  
 lacI ORF: bases 4507-5595 (complementary strand)

## Bibliografía.

- Aravind, L, Vivek Anantharaman, and Eugene V Koonin. 2002. "Monophyly of Class I Aminoacyl tRNA Synthetase, USPA, ETPF, Photolyase, and PP-ATPase Nucleotide-Binding Domains: Implications for Protein Evolution in the RNA." *Proteins* 48(1): 1–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12012333> (May 28, 2014).
- Ariyanayagam, Mark R, Sandra L Oza, Maria Lucia S Guther, and Alan H Fairlamb. 2005. "Phenotypic Analysis of Trypanothione Synthetase Knockdown in the African Trypanosome." *The Biochemical journal* 391(Pt 2): 425–32. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1276942&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (April 16, 2014).
- Aslett, Martin, Cristina Aurrecochea, Matthew Berriman, John Brestelli, Brian P Brunk, Mark Carrington, Daniel P Depledge, Steve Fischer, Bindu Gajria, Xin Gao, Malcolm J Gardner, Alan Gingle, Greg Grant, Omar S Harb, Mark Heiges, Christiane Hertz-Fowler, Robin Houston, Frank Innamorato, John Iodice, Jessica C Kissinger, Eileen Kraemer, Wei Li, Flora J Logan, John a Miller, Siddhartha Mitra, Peter J Myler, Vishal Nayak, Cary Pennington, Isabelle Phan, Deborah F Pinney, Gowthaman Ramasamy, Matthew B Rogers, David S Roos, Chris Ross, Dhileep Sivam, Deborah F Smith, Ganesh Srinivasamoorthy, Christian J Stoeckert, Sandhya Subramanian, Ryan Thibodeau, Adrian Tivey, Charles Treatman, Giles Velarde, and Haiming Wang. 2010. "TriTrypDB: A Functional Genomic Resource for the Trypanosomatidae." *Nucleic acids research* 38(Database issue): D457–62. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2808979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (May 29, 2014).
- Atkins, GL, and IA Nimmo. 1975. "A Comparison of Seven Methods for Fitting the Michaelis-Menten Equation." *Biochem. j* 149(3): 775–77. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0> (November 4, 2014).
- Baker, J.R., and Jennifer Price. 1973. "Growth in Vitro of *Trypanosoma cruzi* as Amastigotes at Temperatures below 37°C." *International Journal for Parasitology* 3(4): 549–51. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0020751973900532> (February 26, 2014).
- Balducci, E, M Emanuelli, and N Raffaelli. 1995. "Assay Methods for Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase of Wide Applicability." *Analytical ...* 228: 64–68. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269785713152> (August 6, 2014).
- Becker, Katja, Stephan Gromer, R. Heiner Schirmer, and Sylke Müller. 2000. "Thioredoxin Reductase as a Pathophysiological Factor and Drug Target." *European Journal of*



- Biochemistry* 267(20): 6118–25. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.2000.01703.x> (April 14, 2014).
- Beis, I, and E A Newsholme. 1975. "The Contents of Adenine Nucleotides, Phosphagens and Some Glycolytic Intermediates in Resting Muscles from Vertebrates and Invertebrates." *The Biochemical journal* 152(1): 23–32. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1172435&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (November 3, 2014).
- Benson, Dennis A, Ilene Karsch-Mizrachi, David J Lipman, James Ostell, and David L Wheeler. 2005. "GenBank." *Nucleic acids research* 33(Database issue): D34–38. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=540017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (May 26, 2014).
- Berger, Felicitas, Corinna Lau, Mathias Dahlmann, and Mathias Ziegler. 2005. "Subcellular Compartmentation and Differential Catalytic Properties of the Three Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase Isoforms." *The Journal of biological chemistry* 280(43): 36334–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16118205> (April 16, 2014).
- Berger, Felicitas, MH Ramirez-Hernandez, and Mathias Ziegler. 2004. "The New Life of a Centenarian: Signalling Functions of NAD (P)." *Trends in biochemical ...* 29(3): 111–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003268> (February 26, 2014).
- Bernstein, Frances C., Thomas F. Koetzle, Grahame J.B. Williams, Edgar F. Meyer, Michael D. Brice, John R. Rodgers, Olga Kennard, Takehiko Shimanouchi, and Mitsuo Tasumi. 1978. "The Protein Data Bank: A Computer-Based Archival File for Macromolecular Structures." *Archives of biochemistry and biophysics* 185(2): 584–91. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986178902047> (November 14, 2014).
- Bi, Jicai, Honghai Wang, and Jianping Xie. 2011. "Comparative Genomics of NAD(P) Biosynthesis and Novel Antibiotic Drug Targets." *Journal of cellular physiology* 226(2): 331–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20857400> (November 11, 2013).
- Bimboim, H.C., and J. Doly. 1979. "A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA." *Nucleic Acids Research* 7(6): 1513–23. <http://nar.oxfordjournals.org/content/7/6/1513.short> (April 20, 2014).
- Birnboim, H C. 1983. 100 Methods in enzymology *Recombinant DNA Part B*. Elsevier. <http://europepmc.org/abstract/MED/6353143> (April 20, 2014).
- Blom, N, S Gammeltoft, and S Brunak. 1999. "Sequence and Structure-Based Prediction of Eukaryotic Protein Phosphorylation Sites." *Journal of molecular biology* 294(5): 1351–62. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283699933107> (May 31, 2014).

- Borges, V M, U G Lopes, W De Souza, and M A Vannier-Santos. 2005. "Cell Structure and Cytokinesis Alterations in Multidrug-Resistant Leishmania (Leishmania) Amazonensis." *Parasitology research* 95(2): 90–96.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15592939> (February 26, 2014).
- Brown, Bette Jo, Zhan Deng, P Andrew Karplus, and Vincent Massey. 1998. "On the Active Site of Old Yellow Enzyme Turnover . Solution of the Crystal Structure of OYE1 from." 273(49): 32753–62.
- Brown, Bette Jo, Jong-Won Hyun, Seshagiri Duvvuri, P Andrew Karplus, and Vincent Massey. 2002. "The Role of Glutamine 114 in Old Yellow Enzyme." *The Journal of biological chemistry* 277(3): 2138–45.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11668181> (November 13, 2013).
- Brunelle, Julie L, and Rachel Green. 2014. "One-Dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE)." *Methods in enzymology* 541: 151–59.  
<http://europepmc.org/abstract/med/24674069> (March 30, 2014).
- Buitrago-Gutiérrez, July, and Maria Helena Ramirez-Hernandez. 2009. Tesis de Pregrado "Aproximación Al Estudio Del Metabolismo Del Dinucleótido de Nicotinamida Adenina En Giardia Lamblia." Universidad Nacional de Colombia.
- Castro, Helena, Carla Sousa, Marta Santos, Anabela Cordeiro-da-Silva, Leopold Flohé, and Ana M Tomás. 2002. "Complementary Antioxidant Defense by Cytoplasmic and Mitochondrial Peroxiredoxins in Leishmania Infantum." *Free Radical Biology and Medicine* 33(11): 1552–62.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584902010894> (April 14, 2014).
- Cavalli-Sforza, Luigi Luca, and Walter Fred Bodmer. 1999. *The Genetics of Human Populations*. Dover Publications.  
<http://books.google.com/books?id=rdZNbApUGUsC&pgis=1> (July 29, 2014).
- Cheng, S, C Fockler, W M Barnes, and R Higuchi. 1994. "Effective Amplification of Long Targets from Cloned Inserts and Human Genomic DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(12): 5695–99.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=44063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (June 18, 2014).
- Cline, J, J C Braman, and H H Hogrefe. 1996. "PCR Fidelity of Pfu DNA Polymerase and Other Thermostable DNA Polymerases." *Nucleic acids research* 24(18): 3546–51.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146123&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (June 18, 2014).



- Combet, C, C Blanchet, C Geourjon, and G Deléage. 2000. "NPS@: Network Protein Sequence Analysis." *Trends in biochemical sciences* 25(3): 147–50.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694887> (May 30, 2014).
- Contreras, Luis E., and Maria Helena Ramirez-Hernandez. 2010. "Aproximación Al Metabolismo Del Dinucleótido de de Nicotinamida Y Adenina (NAD+) En Leishmania." *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas* 22: 97–108.
- Copeland, Robert A. 2004. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. Second Edi. New York / Chichester / Weinheim / Brisbane / Singapore / Toronto: WILEY-VCH. A JOHN WILEY & SONS, INC.  
[http://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=14nqcels\\_ywC&pgis=1](http://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=14nqcels_ywC&pgis=1) (September 22, 2014).
- Cornish-Bowden, Athel. 2013. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Fourth Edi. ed. Uwe Krieg. Berlin: WILEY-VCH. A JOHN WILEY & SONS, INC.  
<http://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=0A6WziHH8fQC&pgis=1> (October 28, 2014).
- Crowe, J, H Döbeli, R Gentz, E Hochuli, D Stüber, and K Henco. 1994. "6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression/purification." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 31: 371–87.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7921034> (August 22, 2014).
- D'Amours, D, S Desnoyers, I D'Silva, and G G Poirier. 1999. "Poly(ADP-Ribosyl)ation Reactions in the Regulation of Nuclear Functions." *The Biochemical journal* 342 ( Pt 2: 249–68.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1220459&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 20, 2014).
- D'Angelo, Igor, Nadia Raffaelli, Valerio Dabusti, and Teresa Lorenzi. 2000. "Structure of Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase: A Key Enzyme in NAD+ Biosynthesis." *Structure* 1(8): 993–1004.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212600001908> (July 29, 2014).
- Daniel, RM, MJ Danson, and Robert Eisinger. 2001. "The Temperature Optima of Enzymes: A New Perspective on an Old Phenomenon." *Trends in biochemical sciences* 26(4): 223–25.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968000401018035> (October 29, 2014).
- Denu, John M. 2007. "Vitamins and Aging: Pathways to NAD+ Synthesis." *Cell* 129(3): 453–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17482537> (November 8, 2013).

- Dieffenbach, C W, T M Lowe, and G S Dveksler. 1993. "General Concepts for PCR Primer Design." *PCR methods and applications* 3(3): S30–37.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8118394> (February 10, 2014).
- Dormeyer, M, N Reckenfelderbäumer, H Ludemann, and R L Krauth-Siegel. 2001. "Trypanothione-Dependent Synthesis of Deoxyribonucleotides by *Trypanosoma Brucei* Ribonucleotide Reductase." *The Journal of biological chemistry* 276(14): 10602–6. <http://www.jbc.org/content/276/14/10602.short> (April 16, 2014).
- Dowd, J E, and D S Riggs. 1965. "A COMPARISON OF ESTIMATES OF MICHAELIS-MENTEN KINETIC CONSTANTS FROM VARIOUS LINEAR TRANSFORMATIONS." *The Journal of biological chemistry* 240: 863–69.  
<http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/jaislocr/ING.BIOQ1/Eadie-Hofstee.pdf> (November 4, 2014).
- Dragosits, Martin, Daniel Nicklas, and Ilias Tagkopoulos. 2012. "A Synthetic Biology Approach to Self-Regulatory Recombinant Protein Production in *Escherichia Coli*." *Journal of biological engineering* 6(1): 2.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3384244&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dumas, C, M Ouellette, J Tovar, M L Cunningham, A H Fairlamb, S Tamar, M Olivier, and B Papadopoulou. 1997. "Disruption of the Trypanothione Reductase Gene of *Leishmania* Decreases Its Ability to Survive Oxidative Stress in Macrophages." *The EMBO journal* 16(10): 2590–98.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1169870&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (April 16, 2014).
- Edgar, Robert C. 2004. "MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput." *Nucleic acids research* 32(5): 1792–97.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=390337&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (February 19, 2014).
- Emanuelli, M, F Carnevali, F Saccucci, F Pierella, A Amici, N Raffaelli, and G Magni. 2001. "Molecular Cloning, Chromosomal Localization, Tissue mRNA Levels, Bacterial Expression, and Enzymatic Properties of Human NMN Adenyltransferase." *The Journal of biological chemistry* 276(1): 406–12.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11027696> (October 31, 2014).
- Emanuelli, Monica, Adolfo Amici, Francesco Carnevali, Francesca Pierella, Nadia Raffaelli, and Giulio Magni. 2003. "Identification and Characterization of a Second NMN Adenyltransferase Gene in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Protein Expression and Purification* 27(2): 357–64.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592802006459> (April 16, 2014).

- Emanuelli, Monica, Francesco Carnevali, Maria Lorenzi, Nadia Raffaelli, Adolfo Amici, Silverio Ruggieri, and Giulio Magni. 1999. "Identification and Characterization of YLR328W, the *Saccharomyces Cerevisiae* Structural Gene Encoding NMN Adenylyltransferase. Expression and Characterization of the Recombinant Enzyme." *FEBS Letters* 455(1-2): 13–17.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579399008522> (February 26, 2014).
- Emanuelli, Monica, Paolo Natalini, Nadia Raffaelli, Silverio Ruggieri, Alberto Vita, and Giulio Magni. 1992. "NAD Biosynthesis in Human Placenta: Purification and Characterization of Homogeneous NMN Adenylyltransferase." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 298(1): 29–34.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000398619290089F> (October 31, 2014).
- Ferbitz, Lars, Timm Maier, Holger Patzelt, Bernd Bukau, Elke Deuerling, and Nenad Ban. 2004. "Trigger Factor in Complex with the Ribosome Forms a Molecular Cradle for Nascent Proteins." *Nature* 431(7008): 590–96.  
<http://www.nature.com/nature/journal/v431/n7008/pdf/nature02899.pdf> (August 21, 2014).
- De Figueiredo, Luis F, Toni I Gossmann, Mathias Ziegler, and Stefan Schuster. 2011. "Pathway Analysis of NAD<sup>+</sup> Metabolism." *The Biochemical journal* 439(2): 341–48.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21729004> (November 26, 2014).
- Filardi, L.S., and Z. Brener. 1987. "Susceptibility and Natural Resistance of *Trypanosoma Cruzi* Strains to Drugs Used Clinically in Chagas Disease." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81(5): 755–59.  
<http://trstmh.oxfordjournals.org/content/81/5/755.short> (April 13, 2014).
- Finn, Robert D, Jaina Mistry, Benjamin Schuster-Böckler, Sam Griffiths-Jones, Volker Hollich, Timo Lassmann, Simon Moxon, Mhairi Marshall, Ajay Khanna, Richard Durbin, Sean R Eddy, Erik L L Sonnhammer, and Alex Bateman. 2006. "Pfam: Clans, Web Tools and Services." *Nucleic acids research* 34(Database issue): D247–51. [http://nar.oxfordjournals.org/content/34/suppl\\_1/D247.short](http://nar.oxfordjournals.org/content/34/suppl_1/D247.short) (May 29, 2014).
- Foster, J W, and a G Moat. 1980. "Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthesis and Pyridine Nucleotide Cycle Metabolism in Microbial Systems." *Microbiological reviews* 44(1): 83–105.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=373235&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Fra, A. M., E. Williamson, K. Simons, and R. G. Parton. 1995. "De Novo Formation of Caveolae in Lymphocytes by Expression of VIP21-Caveolin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(19): 8655–59.  
<http://www.pnas.org/content/92/19/8655.abstract> (February 26, 2014).

- Frishman, Dmitrij, and Patrick Argos. 1996. "Incorporation of Non-Local Interactions in Protein Secondary Structure Prediction from the Amino Acid Sequence." *Protein Engineering, Design and Selection* 9(2): 133–42.  
<http://peds.oxfordjournals.org/content/9/2/133.short> (February 26, 2014).
- Gaberc-Porekar, Vladka, and Viktor Menart. 2001. "Perspectives of Immobilized-Metal Affinity Chromatography." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 49(1-3): 335–60. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165022X0100207X> (August 22, 2014).
- Garavaglia, Silvia, Igor D'Angelo, Monica Emanuelli, Francesco Carnevali, Francesca Pierella, Giulio Magni, and Menico Rizzi. 2002. "Structure of Human NMN Adenyltransferase. A Key Nuclear Enzyme for NAD Homeostasis." *The Journal of biological chemistry* 277(10): 8524–30.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751893> (February 26, 2014).
- Garnier, J, JF Gibrat, B Robson, and RF Doolittle. 1996. "GOR Secondary Structure Prediction Method Version IV." *Methods Enzymol* 266: 540–53.  
[http://scholar.google.com.co/scholar?hl=en&as\\_sdt=0,5&cluster=8993123936311719589#0](http://scholar.google.com.co/scholar?hl=en&as_sdt=0,5&cluster=8993123936311719589#0) (February 26, 2014).
- Gasser, Susan M., and Moira M. Cockell. 2001. "The Molecular Biology of the SIR Proteins." *Gene* 279(1): 1–16.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111901007417> (April 16, 2014).
- Gasteiger, Elisabeth, Christine Hoogland, Alexandre Gattiker, S'everine Duvaud, Marc R. Wilkins, Ron D Appel, and Amos Bairoch. 2005. The Proteomics Protocols Handbook *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. ed. John M. Walker. Totowa, NJ: Humana Press.  
<http://www.springerlink.com/openurl.asp?id=doi:10.1385/1592598900> (May 29, 2014).
- Gazzaniga, Francesca, Rebecca Stebbins, Sheila Z Chang, Mark a McPeck, and Charles Brenner. 2009. "Microbial NAD Metabolism: Lessons from Comparative Genomics." *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 73(3): 529–41, Table of Contents.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2738131&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (April 1, 2014).
- Geer, Lewis Y, Aron Marchler-Bauer, Renata C Geer, Lianyi Han, Jane He, Siqian He, Chunlei Liu, Wenyao Shi, and Stephen H Bryant. 2010. "The NCBI BioSystems Database." *Nucleic acids research* 38(Database issue): D492–96.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2808896&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 28, 2014).

- Ghosh, Sanchari, Suji George, Upasana Roy, Deepti Ramachandran, and Ullas Kolthur-Seetharam. 2010. "NAD: A Master Regulator of Transcription." *Biochimica et biophysica acta* 1799(10-12): 681–93.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713194> (November 13, 2013).
- Gomez, Consuelo, M Esther Ramirez, Mercedes Calixto-Galvez, Olivia Medel, and Mario a Rodríguez. 2010. "Regulation of Gene Expression in Protozoa Parasites." *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010: 726045.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2830571&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (June 18, 2014).
- Gossmann, Toni I, Mathias Ziegler, Pål Puntervoll, Luis F de Figueiredo, Stefan Schuster, and Ines Heiland. 2012. "NAD(+) Biosynthesis and Salvage--a Phylogenetic Perspective." *The FEBS journal* 279(18): 3355–63.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22404877> (November 26, 2014).
- Gründemann, D, and E Schömig. 1996. "Protection of DNA during Preparative Agarose Gel Electrophoresis against Damage Induced by Ultraviolet Light." *BioTechniques* 21(5): 898–903. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8922632> (June 19, 2014).
- Gu, J, C G Stephenson, and M J Iadarola. 1994. "Recombinant Proteins Attached to a Nickel-NTA Column: Use in Affinity Purification of Antibodies." *BioTechniques* 17(2): 257, 260, 262. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7980919> (August 22, 2014).
- Hamilton, Patrick B, Jamie R Stevens, Michael W Gaunt, Jennifer Gidley, and Wendy C Gibson. 2004. "Trypanosomes Are Monophyletic: Evidence from Genes for Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase and Small Subunit Ribosomal RNA." *International journal for parasitology* 34(12): 1393–1404.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542100> (November 17, 2013).
- Han, Seungil, Michael D Forman, Pat Loulakis, Michelle H Rosner, Zhi Xie, Hong Wang, Dennis E Danley, Wei Yuan, John Schafer, and Zuoyu Xu. 2006. "Crystal Structure of Nicotinic Acid Mononucleotide Adenylyltransferase from *Staphylococcus Aureus*: Structural Basis for NaAD Interaction in Functional Dimer." *Journal of molecular biology* 360(4): 814–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16784754> (June 26, 2014).
- Hanahan, Douglas, and Cold Spring Harbor. 1983. "Studies ON T R a N S F O R M a T I O N O F *Escherichia Coli* with P L a S M I D S Department of Biochemistry and Molec ~ Dar Biology." 0: 557–80.
- He, M, A Wilde, and M A Kaderbhai. 1990. "A Simple Single-Step Procedure for Small-Scale Preparation of *Escherichia Coli* Plasmids." *Nucleic acids research* 18(6): 1660.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=330566&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (April 20, 2014).
- Hesterkamp, T, S Hauser, H Lütcke, and B Bukau. 1996. "Escherichia Coli Trigger Factor Is a Prolyl Isomerase That Associates with Nascent Polypeptide Chains."

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(9): 4437–41.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=39556&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (June 26, 2014).
- Holm, Liisa, and Päivi Rosenström. 2010. "Dali Server: Conservation Mapping in 3D." *Nucleic acids research* 38(Web Server issue): W545–49.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2896194&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (May 23, 2014).
- Jayaram, H N, P Kusumanchi, and J a Yalowitz. 2011. "NMNAT Expression and Its Relation to NAD Metabolism." *Current medicinal chemistry* 18(13): 1962–72.
- Kato, Akira, Kazuya Uenohara, Mitsuru Akita, and Takashi Hashimoto. 2006. "Early Steps in the Biosynthesis of NAD in Arabidopsis Start with Aspartate and Occur in the Plastid." *Plant physiology* 141(3): 851–57.  
<http://www.plantphysiol.org/content/141/3/851.full> (April 16, 2014).
- Kiemer, Lars, Jannick Dyrlov Bendtsen, and Nikolaj Blom. 2005. "NetAcet: Prediction of N-Terminal Acetylation Sites." *Bioinformatics (Oxford, England)* 21(7): 1269–70.  
<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/21/7/1269.short> (June 1, 2014).
- Kirsch, M. 2001. "NAD(P)H, a Directly Operating Antioxidant?" *The FASEB Journal* 15(9): 1569–74. <http://www.fasebj.org/content/15/9/1569.full> (February 26, 2014).
- Krauth-Siegel, R Luise, and Marcelo a Comini. 2008. "Redox Control in Trypanosomatids, Parasitic Protozoa with Trypanothione-Based Thiol Metabolism." *Biochimica et biophysica acta* 1780(11): 1236–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395526> (November 26, 2013).
- Krauth-Siegel, R.L, and G.H Coombs. 1999a. "Enzymes of Parasite Thiol Metabolism as Drug Targets." *Parasitology Today* 15(10): 404–9.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169475899015161> (April 14, 2014).
- . 1999b. "Enzymes of Parasite Thiol Metabolism as Drug Targets." *Parasitology Today* 15(10): 404–9.
- Krauth-Siegel, R.Luise, S.K. Meiering, and H. Schmidt. 2003. "The Parasite-Specific Trypanothione Metabolism of Trypanosoma and Leishmania." *Biological Chemistry* 384(4): 539–49. <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2003.384.issue-4/bc.2003.062/bc.2003.062.xml> (February 26, 2014).
- Kubata, B. K., Z. Kabututu, T. Nozaki, C. J. Munday, S. Fukuzumi, K. Ohkubo, M. Lazarus, T. Maruyama, S. K. Martin, M. Duszenko, and Y. Urade. 2002. "A Key Role for Old Yellow Enzyme in the Metabolism of Drugs by Trypanosoma Cruzi." *Journal*

- of Experimental Medicine* 196(9): 1241–52.  
<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20020885> (November 13, 2013).
- LAEMMLI, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680–85.  
<http://dx.doi.org/10.1038/227680a0> (July 10, 2014).
- Lau, Corinna, Christian Dölle, Toni I Gossmann, Line Agledal, Marc Niere, and Mathias Ziegler. 2010. "Isoform-Specific Targeting and Interaction Domains in Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferases." *The Journal of biological chemistry* 285(24): 18868–76.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2881809&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (April 16, 2014).
- Lau, Corinna, Marc Niere, and Mathias Ziegler. 2009. "The NMN/NaMN Adenylyltransferase (NMNAT) Protein Family." *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 14(14): 410–31. <http://europepmc.org/abstract/MED/19273075/reload=0> (April 16, 2014).
- Leopold, Jane A, Ying-Yi Zhang, Anne W Scribner, Robert C Stanton, and Joseph Loscalzo. 2003. "Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Overexpression Decreases Endothelial Cell Oxidant Stress and Increases Bioavailable Nitric Oxide." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23(3): 411–17.  
<http://atvb.ahajournals.org/content/23/3/411.short> (April 16, 2014).
- Levick, M P, E Tetaud, a H Fairlamb, and J M Blackwell. 1998. "Identification and Characterisation of a Functional Peroxidoxin from Leishmania Major." *Molecular and biochemical parasitology* 96(1-2): 125–37.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851612> (April 14, 2014).
- Life Technologies. 2010. "Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits." (June 2010): 1–60. [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pettopo\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pettopo_man.pdf).
- Lovell, SC, and IW Davis. 2003. "Structure Validation by C $\alpha$  Geometry:  $\Phi$ ,  $\Psi$  and C $\beta$  Deviation." *Proteins: Structure, ...* 450(August 2002): 437–50.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.10286/full> (June 8, 2014).
- Mandel, M., and A. Higa. 1970. "Calcium-Dependent Bacteriophage DNA Infection." *Journal of Molecular Biology* 53(1): 159–62.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283670900513> (November 26, 2014).
- Marangoni, AG. 2003. *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*. Hoboken, New Jersey: WILEY-VCH. A JOHN WILEY & SONS, INC.  
[http://www.medschool.lsuhs.edu/biochemistry/Enzyme Kinetics.pdf](http://www.medschool.lsuhs.edu/biochemistry/Enzyme%20Kinetics.pdf) (October 29, 2014).

- Marchler-Bauer, Aron, Chanjuan Zheng, Farideh Chitsaz, Myra K Derbyshire, Lewis Y Geer, Renata C Geer, Noreen R Gonzales, Marc Gwadz, David I Hurwitz, Christopher J Lanczycki, Fu Lu, Shennan Lu, Gabriele H Marchler, James S Song, Narmada Thanki, Roxanne A Yamashita, Dachuan Zhang, and Stephen H Bryant. 2013. "CDD: Conserved Domains and Protein Three-Dimensional Structure." *Nucleic acids research* 41(Database issue): D348–52.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3531192&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (May 25, 2014).
- Marchuk, Douglas, Mitchell Drumm, Ann Saulino, and Francis S. Collins. 1991. "Construction of T-Vectors, a Rapid and General System for Direct Cloning of Unmodified PCR Products." *Nucleic Acids Research* 19(5): 1154–1154.  
<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/19.5.1154> (June 18, 2014).
- Marín-Mogollón, Catherin Y., and Maria Helena Ramirez. 2010. "Identificación, Expresión Y Caracterización de La Nicotinamida/nicotinato Mononucleótido Adenililtransferasa de Plasmodium Falciparum (PfNMNAT)." Universidad Nacional de Colombia.
- Maya, Juan Diego, Soledad Bollo, Luis J. Nuñez-Vergara, Juan a. Squella, Yolanda Repetto, Antonio Morello, Jacques Périé, and Gérard Chauvière. 2003. "Trypanosoma Cruzi: Effect and Mode of Action of Nitroimidazole and Nitrofurán Derivatives." *Biochemical Pharmacology* 65(6): 999–1006.  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295202016635> (December 8, 2013).
- Maya, Juan Diego, Bruce K Cassels, Patricio Iturriaga-Vásquez, Jorge Ferreira, Mario Faúndez, Norbel Galanti, Arturo Ferreira, and Antonio Morello. 2007. "Mode of Action of Natural and Synthetic Drugs against Trypanosoma Cruzi and Their Interaction with the Mammalian Host." *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 146(4): 601–20.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16626984> (November 13, 2013).
- Minard, Karyl I, and Lee McAlister-Henn. 2001. "Antioxidant Function of Cytosolic Sources of NADPH in Yeast." *Free Radical Biology and Medicine* 31(6): 832–43.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584901006669> (April 16, 2014).
- Miralles, D, C Marín, R Magán, C Fernández-Ramos, E Entrala, O Córdova, F Vargas, and M Sánchez-Moreno. 2002. "In Vitro Culture and Biochemical Characterization of Six Trypanosome Isolates from Peru and Brazil." *Experimental Parasitology* 102(1): 23–29. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489402001418> (February 26, 2014).
- Molina-garza, Zinnia Judith, C Dra, José Luis Rosales-encina, Lucio Galaviz-silva, and Daniel Molina-garza. 2007. "Prevalencia de Trypanosoma Trypanosoma Cruzi Cruzi En Triatominos Silvestres de Nuevo León , México." 49(1): 37–44.



- Mori, Sadao, and Howard G. Barth. 1999. *Size Exclusion Chromatography*. Nagoya, Japan: Springer Science & Business Media.  
<http://books.google.com/books?id=2D3R8qvJgt8C&pgis=1> (November 4, 2014).
- Müller, Sylke, Eva Liebau, Rolf D. Walter, and R. Luise Krauth-Siegel. 2003. "Thiol-Based Redox Metabolism of Protozoan Parasites." *Trends in Parasitology* 19(7): 320–28.  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492203001417> (November 26, 2013).
- Muñoz, Jose, Montserrat Portús, Manuel Corachan, Victoria Fumadó, and Joaquim Gascon. 2007. "Congenital Trypanosoma Cruzi Infection in a Non-Endemic Area." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101(11): 1161–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17655897> (November 17, 2013).
- Murta, Silvana M.F, Ricardo T Gazzinelli, Zigman Brener, and Alvaro J Romanha. 1998. "Molecular Characterization of Susceptible and Naturally Resistant Strains of Trypanosoma Cruzi to Benznidazole and Nifurtimox." *Molecular and Biochemical Parasitology* 93(2): 203–14.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685198000371> (April 13, 2014).
- Nagajyothi, Fnu, Fabiana S Machado, Barbara a Burleigh, Linda a Jelicks, Philipp E Scherer, Shankar Mukherjee, Michael P Lisanti, Louis M Weiss, Nisha J Garg, and Herbert B Tanowitz. 2012. "Mechanisms of Trypanosoma Cruzi Persistence in Chagas Disease." *Cellular microbiology* 14(5): 634–43.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556388&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (August 18, 2014).
- Nishihara, K., M. Kanemori, H. Yanagi, and T. Yura. 2000. "Overexpression of Trigger Factor Prevents Aggregation of Recombinant Proteins in Escherichia Coli." *Applied and Environmental Microbiology* 66(3): 884–89.  
<http://aem.asm.org/content/66/3/884.full> (August 21, 2014).
- Olland, Andrea M, Kathryn W Underwood, Robert M Czerwinski, Mei-Chu Lo, Ann Aulabaugh, Joel Bard, Mark L Stahl, William S Somers, Francis X Sullivan, and Rajiv Chopra. 2002. "Identification, Characterization, and Crystal Structure of Bacillus Subtilis Nicotinic Acid Mononucleotide Adenylyltransferase." *The Journal of biological chemistry* 277(5): 3698–3707. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704676> (June 26, 2014).
- Paramchuk, Wendy J, Said O Ismail, Ajay Bhatia, and Lashitew Gedamu. 1997. "Cloning, Characterization and Overexpression of Two Iron Superoxide Dismutase cDNAs from Leishmania Chagasi: Role in pathogenesis1Note: L.c.FeSODA and L.c.SODB cDNA Sequences Have Been Assigned EMBL/GenBank™ Data Base Accession Numbers AF003964 and AF0039." *Molecular and Biochemical Parasitology* 90(1): 203–21. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685197001412> (April 14, 2014).

- Pereira, C A, G D Alonso, M C Paveto, A Iribarren, M L Cabanas, H N Torres, and M M Flawiá. 2000. "Trypanosoma Cruzi Arginine Kinase Characterization and Cloning. A Novel Energetic Pathway in Protozoan Parasites." *The Journal of biological chemistry* 275(2): 1495–1501. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10625703> (February 26, 2014).
- Petrat, Frank, Stanislaw Pindiur, Michael Kirsch, and Herbert de Groot. 2003. "NAD(P)H, a Primary Target of 1O<sub>2</sub> in Mitochondria of Intact Cells." *The Journal of biological chemistry* 278(5): 3298–3307. <http://www.jbc.org/content/278/5/3298.short> (April 16, 2014).
- Pettersen, Eric F, Thomas D Goddard, Conrad C Huang, Gregory S Couch, Daniel M Greenblatt, Elaine C Meng, and Thomas E Ferrin. 2004. "UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *Journal of computational chemistry* 25(13): 1605–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264254> (February 19, 2014).
- Pruitt, Kim D, Garth R Brown, Susan M Hiatt, Françoise Thibaud-Nissen, Alexander Astashyn, Olga Ermolaeva, Catherine M Farrell, Jennifer Hart, Melissa J Landrum, Kelly M McGarvey, Michael R Murphy, Nuala A O'Leary, Shashikant Pujar, Bhanu Rajput, Sanjida H Rangwala, Lillian D Riddick, Andrei Shkeda, Hanzhen Sun, Pamela Tamez, Raymond E Tully, Craig Wallin, David Webb, Janet Weber, Wendy Wu, Michael DiCuccio, Paul Kitts, Donna R Maglott, Terence D Murphy, and James M Ostell. 2014. "RefSeq: An Update on Mammalian Reference Sequences." *Nucleic acids research* 42(Database issue): D756–63. <http://nar.oxfordjournals.org/content/42/D1/D756.short> (May 29, 2014).
- Raffaelli, Nadia, Leonardo Sorci, and Adolfo Amici. 2002. "Identification of a Novel Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase." *Biochemical and ...* 297(4): 835–40. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X02022854> (November 2, 2014).
- Ramprasad, M. P., V. Terpstra, N. Kondratenko, O. Quehenberger, and D. Steinberg. 1996. "Cell Surface Expression of Mouse Macrosialin and Human CD68 and Their Role as Macrophage Receptors for Oxidized Low Density Lipoprotein." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(25): 14833–38. <http://www.pnas.org/content/93/25/14833.short> (February 26, 2014).
- Rassi, Anis, and Joffre Marcondes de Rezende. 2012. "American Trypanosomiasis (Chagas Disease)." *Infectious disease clinics of North America* 26(2): 275–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24144418> (February 26, 2014).
- Reed, Michael C, Anna Lieb, and H Frederik Nijhout. 2010. "The Biological Significance of Substrate Inhibition: A Mechanism with Diverse Functions." *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 32(5): 422–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20414900> (October 24, 2014).

- Rocha, Gustavo Miranda, Dirceu Esdras Teixeira, Kildare Miranda, Gilberto Weissmüller, Paulo Mascarello Bisch, and Wanderley de Souza. 2010. "Structural Changes of the Paraflagellar Rod during Flagellar Beating in *Trypanosoma Cruzi*." *PloS one* 5(6): e11407.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2894934&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (August 1, 2014).
- Rodrigues Coura, José, and Solange L de Castro. 2002. "A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97(1): 3–24.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992141>.
- Romão, P.R.T., J. Tovar, S.G. Fonseca, R.H. Moraes, A.K. Cruz, J.S. Hothersall, A.A. Noronha-Dutra, S.H. Ferreira, and F.Q. Cunha. 2006. "Glutathione and the Redox Control System Trypanothione/trypanothione Reductase Are Involved in the Protection of *Leishmania* Spp. against Nitrosothiol-Induced Cytotoxicity." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39(3): 355–63.  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2006000300006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2006000300006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) (April 14, 2014).
- Rosano, Germán L, and Eduardo a Ceccarelli. 2009. "Rare Codon Content Affects the Solubility of Recombinant Proteins in a Codon Bias-Adjusted *Escherichia Coli* Strain." *Microbial Cell Factories* 8(1): 41.  
<http://www.microbialcellfactories.com/content/8/1/41> (May 29, 2014).
- Rost, B, and C Sander. 1993. "Prediction of Protein Secondary Structure at Better than 70% Accuracy." *Journal of molecular biology* 232(2): 584–99.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283683714130> (February 26, 2014).
- Roy, Ambrish, Alper Kucukural, and Yang Zhang. 2010. "I-TASSER: A Unified Platform for Automated Protein Structure and Function Prediction." *Nature protocols* 5(4): 725–38.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849174&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (January 24, 2014).
- Roy, Ambrish, Jianyi Yang, and Yang Zhang. 2012. "COFACTOR: An Accurate Comparative Algorithm for Structure-Based Protein Function Annotation." *Nucleic acids research* 40(Web Server issue): W471–77.  
<http://nar.oxfordjournals.org/content/40/W1/W471.short> (February 10, 2014).
- Sambrook, Joseph, and David W Russell. 2006. "The Basic Polymerase Chain Reaction." *CSH protocols* 2006(1): pdb.prot3824 – .  
<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.prot3824.citation> (November 26, 2014).
- San-Miguel, Teresa, Pedro Pérez-Bermúdez, and Isabel Gavidia. 2013. "Production of Soluble Eukaryotic Recombinant Proteins in *E. Coli* Is Favoured in Early Log-Phase Cultures Induced at Low Temperature." *SpringerPlus* 2(1): 89.

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3602615&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (May 28, 2014).

Saridakis, V, D Christendat, M S Kimber, a Dharamsi, a M Edwards, and E F Pai. 2001. "Insights into Ligand Binding and Catalysis of a Central Step in NAD<sup>+</sup> Synthesis: Structures of Methanobacterium Thermoautotrophicum NMN Adenylyltransferase Complexes." *The Journal of biological chemistry* 276(10): 7225–32.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063748> (July 29, 2014).

Scheer, Maurice, Andreas Grote, Antje Chang, Ida Schomburg, Cornelia Munaretto, Michael Rother, Carola Söhngen, Michael Stelzer, Juliane Thiele, and Dietmar Schomburg. 2011. "BRENDA, the Enzyme Information System in 2011." *Nucleic acids research* 39(Database issue): D670–76.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3013686&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 30, 2014).

Schmidt, Heide, and R Luise Krauth-Siegel. 2003. "Functional and Physicochemical Characterization of the Thioredoxin System in Trypanosoma Brucei." *The Journal of biological chemistry* 278(47): 46329–36.  
<http://www.jbc.org/content/278/47/46329.short> (April 14, 2014).

Schmunis, Gabriel a, and Zaida E Yadon. 2010. "Chagas Disease: A Latin American Health Problem Becoming a World Health Problem." *Acta tropica* 115(1-2): 14–21.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932071> (November 7, 2013).

Scholz, C, G Stoller, T Zarnt, G Fischer, and F X Schmid. 1997. "Cooperation of Enzymatic and Chaperone Functions of Trigger Factor in the Catalysis of Protein Folding." *The EMBO journal* 16(1): 54–58.  
<http://emboj.embopress.org/content/16/1/54.abstract> (August 21, 2014).

Schomburg, Ida, Antje Chang, Christian Ebeling, Marion Gremse, Christian Heldt, Gregor Huhn, and Dietmar Schomburg. 2004. "BRENDA, the Enzyme Database: Updates and Major New Developments." *Nucleic acids research* 32(Database issue): D431–33.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=308815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (October 9, 2014).

Schweiger, Manfred, Klaus Hennig, Felicitas Lerner, Marc Niere, Monica Hirsch-Kauffmann, Thomas Specht, Christoph Weise, Shiao Li Oei, and Mathias Ziegler. 2001. "Characterization of Recombinant Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyl Transferase (NMNAT), a Nuclear Enzyme Essential for NAD Synthesis." *FEBS Letters* 492(1-2): 95–100.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579301021809> (April 16, 2014).

- Selwyn, M.J. 1965. "A Simple Test for Inactivation of an Enzyme during Assay." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation* 105(1): 193–95. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926659365801904> (October 31, 2014).
- Sievers, Fabian, Andreas Wilm, David Dineen, Toby J Gibson, Kevin Karplus, Weizhong Li, Rodrigo Lopez, Hamish McWilliam, Michael Remmert, Johannes Söding, Julie D Thompson, and Desmond G Higgins. 2011. "Fast, Scalable Generation of High-Quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega." *Molecular systems biology* 7: 539. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3261699&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (May 29, 2014).
- Sorci, Leonardo, Yongping Pan, Yvonne Eyobo, Irina Rodionova, Nian Huang, Oleg Kurnasov, Shijun Zhong, Alexander D MacKerell, Hong Zhang, and Andrei L Osterman. 2009. "Targeting NAD Biosynthesis in Bacterial Pathogens: Structure-Based Development of Inhibitors of Nicotinate Mononucleotide Adenylyltransferase NadD." *Chemistry & biology* 16(8): 849–61. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2770502&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (December 8, 2013).
- Sørensen, Hans Peter, and Kim Kusk Mortensen. 2005. "Soluble Expression of Recombinant Proteins in the Cytoplasm of Escherichia Coli." *Microbial cell factories* 4(1): 1. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=544838&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (May 27, 2014).
- Souza, Renata T, Fábio M Lima, Roberto Moraes Barros, Danielle R Cortez, Michele F Santos, Esteban M Cordero, Jeronimo Conceição Ruiz, Samuel Goldenberg, Marta M G Teixeira, and José Franco da Silveira. 2011. "Genome Size, Karyotype Polymorphism and Chromosomal Evolution in Trypanosoma Cruzi." *PloS one* 6(8): e23042. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3155523&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (June 4, 2014).
- Stancek, Martin, Robert Schnell, and Monica Rydén-Aulin. 2005. "Analysis of Escherichia Coli Nicotinate Mononucleotide Adenylyltransferase Mutants in Vivo and in Vitro." *BMC biochemistry* 6(1): 16. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/6/16> (April 16, 2014).
- Stevens, J R. 2008. "Kinteoplastid Phylogenetics, with Special Reference to the Evolution of Parasitic Trypanosomes." (August): 226–32.
- Storer, AC, and A Cornish-Bowden. 1976. "Concentration of MgATP2-and Other Ions in Solution. Calculation of the True Concentrations of Species Present in Mixtures of Associating Ions." *Biochem. J* 159(1): 1–5. <http://www.biochemj.org/bj/159/bj1590001.htm> (October 17, 2014).

- Tang, X, Y Nakata, H O Li, M Zhang, H Gao, a Fujita, O Sakatsume, T Ohta, and K Yokoyama. 1994. "The Optimization of Preparations of Competent Cells for Transformation of E. Coli." *Nucleic acids research* 22(14): 2857–58. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=308259&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Thomas, T M, and R K Scopes. 1998. "The Effects of Temperature on the Kinetics and Stability of Mesophilic and Thermophilic 3-Phosphoglycerate Kinases." *The Biochemical journal* 330 (Pt 3): 1087–95. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1219248&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (October 29, 2014).
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76(9): 4350–54. <http://www.pnas.org/content/76/9/4350.short> (March 25, 2014).
- Turrens, Julio F. 2004. "Oxidative Stress and Antioxidant Defenses: A Target for the Treatment of Diseases Caused by Parasitic Protozoa." *Molecular aspects of medicine* 25(1-2): 211–20. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299704000226> (February 26, 2014).
- Uchiyama, Nahoko, Zakayi Kabututu, Bruno K Kubata, Fumiyuki Kiuchi, Michiho Ito, Junko Nakajima-shimada, Takashi Aoki, Kei Ohkubo, Shunichi Fukuzumi, K Samuel, Gisho Honda, Yoshihiro Urade, and Samuel K Martin. 2005. "Antichagasic Activity of Komaroviquinone Is Due to Generation of Reactive Oxygen Species Catalyzed by Trypanosoma Cruzi Old Yellow Enzyme Antichagasic Activity of Komaroviquinone Is Due to Generation of Reactive Oxygen Species Catalyzed by Trypanosoma Cru."
- Vanhamme, L, and E Pays. 1995. "Control of Gene Expression in Trypanosomes." *Microbiol. Rev.* 59(2): 223–40. <http://mmbr.asm.org/content/59/2/223.short> (June 18, 2014).
- Vincze, Tamas, Janos Posfai, and Richard J Roberts. 2003. "NEBcutter: A Program to Cleave DNA with Restriction Enzymes." *Nucleic acids research* 31(13): 3688–91. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=168933&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (February 26, 2014).
- Wang, J, T Araki, T Ogawa, M Matsuoka, and H Fukuda. 1999. "A Method of Graphically Analyzing Substrate-Inhibition Kinetics." *Biotechnology and bioengineering* 62(4): 402–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099551> (October 30, 2014).
- Werner, Erik, Mathias Ziegler, Felicitas Lerner, Manfred Schweiger, and Udo Heinemann. 2002. "Crystal Structure of Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase in Complex with NMN." *FEBS Letters* 516(1-3): 239–44.

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579302025565> (April 16, 2014).
- Wolf, Y I, L Aravind, N V Grishin, and E V Koonin. 1999. "Evolution of Aminoacyl-tRNA Synthetases--Analysis of Unique Domain Architectures and Phylogenetic Trees Reveals a Complex History of Horizontal Gene Transfer Events." *Genome research* 9(8): 689–710. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10447505> (May 30, 2014).
- Xue, Yu, Jian Ren, Xinjiao Gao, Changjiang Jin, Longping Wen, and Xuebiao Yao. 2008. "GPS 2.0, a Tool to Predict Kinase-Specific Phosphorylation Sites in Hierarchy." *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7(9): 1598–1608. <http://www.mcponline.org/content/7/9/1598.short> (June 1, 2014).
- Ymer, S. 1991. "Heat Inactivation of DNA Ligase prior to Electroporation Increases Transformation Efficiency." *Nucleic acids research* 19(24): 6960. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=329344&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (June 18, 2014).
- Zhang, Xuejun, Oleg V Kurnasov, Subramanian Karthikeyan, Nick V Grishin, Andrei L Osterman, and Hong Zhang. 2003. "Structural Characterization of a Human Cytosolic NMN/NaMN Adenylyltransferase and Implication in Human NAD Biosynthesis." *The Journal of biological chemistry* 278(15): 13503–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574164> (November 26, 2014).
- Zhang, Yang. 2008. "I-TASSER Server for Protein 3D Structure Prediction." *BMC bioinformatics* 9: 40. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2245901&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (February 17, 2014).
- Zhang, Yang, and Jeffrey Skolnick. 2005. "TM-Align: A Protein Structure Alignment Algorithm Based on the TM-Score." *Nucleic acids research* 33(7): 2302–9. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1084323&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (May 26, 2014).
- Zhou, Tianjun, Oleg Kurnasov, Diana R Tomchick, Derk D Binns, Nick V Grishin, Victor E Marquez, Andrei L Osterman, and Hong Zhang. 2002a. "Structure of Human Nicotinamide/nicotinic Acid Mononucleotide Adenylyltransferase. Basis for the Dual Substrate Specificity and Activation of the Oncolytic Agent Tiazofurin." *The Journal of biological chemistry* 277(15): 13148–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788603> (February 26, 2014).
- . 2002b. "Structure of Human Nicotinamide/nicotinic Acid Mononucleotide Adenylyltransferase. Basis for the Dual Substrate Specificity and Activation of the Oncolytic Agent Tiazofurin." *The Journal of biological chemistry* 277(15): 13148–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788603> (July 27, 2014).

Ziegler, Mathias. 2000. "New Functions of a Long-Known Molecule. Emerging Roles of NAD in Cellular Signaling." *European journal of biochemistry / FEBS* 267(6): 1550–64. <http://europepmc.org/abstract/MED/10712584> (April 16, 2014).